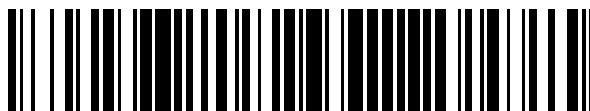


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 957**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2007 E 07868188 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 1989231**

54 Título: **Terapia combinada que implica antagonistas alfa5beta1**

30 Prioridad:

21.03.2006 US 784704 P
22.03.2006 US 785330 P
22.12.2006 US 871743 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHUNTHARAPAI, ANAN;
PLOWMAN, GREG;
TESSIER-LAVIGNE, MARC;
WU, YAN y
YE, WEILAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 544 957 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

Terapia combinada que implica antagonistas alfa5beta1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos antagonistas anti-VEGF y antagonistas anti-alfa5beta1 para inhibir la angiogénesis en enfermedades. La presente invención también se refiere a composiciones y kits.

10 Antecedentes de la invención

El importante papel del VEGF-A en la angiogénesis patológica y no patológica está bien establecido. La administración del VEGF en modelos in vivo induce una potente respuesta angiogénica in vivo (Plouet, J et al., (1989) EMBO J. 8:3801-3808; Leung, D.W., et al., (1989) Science 246:1306-1309). La pérdida de un único alelo VEGF-A daba lugar a la aparición de una letalidad embrionaria en ratones (Carmeliet, P., et al., (1996) Nature 380:435-439; Ferrara, N et al., (1996) Nature 380:439-442). El VEGF se conoce también como un factor de permeabilidad vascular debido a su capacidad para producir filtraciones vasculares (Senger, D.R. et al., (1995) Science 219:983-985; Dvorak, H.F., et al., (1995) Am. J. Pathol. 146:1029-1039). Por lo tanto el VEGF-A está implicado en la angiogénesis del desarrollo, reproductiva y del hueso además de otras angiogénesis no patológicas.

El VEGF-A se une a dos receptores tirosina quinasas (RTK), VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR, Flk-1). Se cree que el VEGFR-2 es el mediador más importante del aumento de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad de VEGF-A. En febrero del 2004, la Administración Americana de Alimentos y Fármacos (FDA) aprobó el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)-A, para el tratamiento del cáncer colorrectal metastático en combinación con regímenes quimioterápicos basados en el 5-fluorouracilo (FU). Posteriormente, la FDA aprobó el pegaptinib, un aptámero que bloquea la isoforma ácida de 165 aminoácidos del VEGF-A, para el tratamiento de la forma húmeda (neovascular) de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

A pesar de estos avances, muchos pacientes tratados con antagonistas del VEGF eventualmente sucumben a su enfermedad. Consecuentemente, exista la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos y tratamientos para tratar enfermedades que no responden o que solo responden parcialmente a las terapias con antagonistas del VEGF. También existe la necesidad de desarrollar terapias alternativas y/o mejores para tratar el cáncer y que empeoren las enfermedades, causados por, o que son el efecto de angiogénesis anormal.

El documento WO 2004/056308 describe un ensayo de crecimiento HUVEC en el que están presentes en la mezcla de ensayo un anticuerpo anti-VEGF y un anticuerpo anti-alfa5beta1, junto con células HUVEC.

40 Sumario de la invención

La presente invención como se define en las reivindicaciones, se refiere a medicamentos y medios para tratar pacientes que se beneficiarían de la disminución de la angiogénesis, que padecen angiogénesis anormal y/o que padecen una neoplasia. De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona medios para inhibir la angiogénesis en un sujeto por la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de VEGF y un antagonista alfa5beta1 concurrentemente.

También se desvelan nuevos anticuerpos anti-alfa5beta1, kits y composiciones que los comprenden, y métodos para fabricarlos o usarlos. El nuevo anticuerpo anti-alfa5beta1 puede ser el anticuerpo 7H5 o el anticuerpo 7H12 descritos en el presente documento, o una forma humanizada o quimérica de los mismos. El anticuerpo 7H5 o el anticuerpo 7H12, o la forma humanizada o quimérica de los mismos, pueden estar en forma de un fragmento Fab, Fab', un F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), un Fv; un diacuerpo, un anticuerpo multi-específico y un anticuerpo lineal. Los nuevos anticuerpos anti-alfa5beta1 se pueden conjugar con otra entidad tal como, pero no limitada a, un agente terapéutico o un colorante fluorescente u otro marcador para detectar alfa5beta1 en pacientes o en muestras del paciente. Tales nuevos anticuerpos alfa5beta1 se pueden utilizar en varios métodos diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, tales anticuerpos anti-alfa5beta1 se pueden utilizar en el tratamiento de angiogénesis anormal, neoplasia, enfermedades oculares y enfermedades autoinmunitarias. Tales anticuerpos se pueden utilizar para detectar proteína alfa5beta1 en pacientes o muestras del paciente poniendo en contacto tales anticuerpos contra la proteína alfa5beta1 en pacientes o en muestras del paciente y determinar cualitativa o cuantitativamente el anticuerpo anti-alfa5beta1 unido a la proteína alfa5beta1.

De acuerdo con otra realización más como se define en las reivindicaciones la presente invención proporciona medios para el tratamiento del cáncer en un sujeto administrando un antagonista VEGF y un antagonista alfa5beta1 concurrente o secuencialmente que se proporciona. De acuerdo con una realización preferida, el cáncer responde a terapias con antagonistas del VEGF. En otra realización, se proporcionan medios para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que incluye la degeneración húmeda relacionada con la edad, en un sujeto que padece AMD administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de VEGF y una

antagonista alfa5beta1 concurrentemente.

En una realización, el sujeto que se va a tratar con el antagonista alfa5beta1 tiene elevados niveles de alfa5beta1 en un tejido enfermo en comparación con el tejido de un sujeto que no padece la enfermedad. En este caso, el método puede incluir además la etapa de detectar el alfa5beta1 en el sujeto, por ejemplo, en un tejido enfermo tras el tratamiento con un antagonista VEGF. De acuerdo con una realización, el cáncer invasivo es un cáncer metastático. De acuerdo con otra realización, el estadio temprano del cáncer es un cáncer tratado por terapia adyuvante (por ejemplo, quimioterapia o eliminación quirúrgica).

El sujeto padece una enfermedad que tiene angiogénesis excesiva. La enfermedad se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en cáncer, una enfermedad inmunitaria o una enfermedad ocular. De acuerdo con una realización preferida, la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor sólido, un tumor metastático, un tumor de tejidos blandos, una enfermedad que tiene neovascularización ocular, una enfermedad inflamatoria que tiene angiogénesis anormal, una enfermedad que aparece tras un trasplante en un sujeto y una enfermedad que tiene proliferación anormal de tejido fibrovascular. De acuerdo con otra realización preferida, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama (incluyendo el cáncer de mama metastático), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal (incluyendo el cáncer colorrectal metastático), cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de pulmón de células no pequeñas), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crónica, cáncer de células renales, cáncer de próstata incluyendo el cáncer de próstata refractario a hormonas, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer ovárico, mesotelioma, cáncer de tejidos blandos, tumor del estroma gastrointestinal, glioblastoma multiforme y mieloma múltiple. De acuerdo con otra realización preferida, la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en retinopatía, degeneración macular inducida por la edad (por ejemplo, AMD húmeda), edema macular diabético, rubeosis; psoriasis, una enfermedad inflamatoria renal, síndrome hemolítico urémico, nefropatía diabética (por ejemplo, retinopatía diabética), artritis (por ejemplo, artritis psoriásica, osteoartritis, artritis reumatoide), enfermedad inflamatoria intestinal, inflamación crónica, desprendimiento de retina crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, miopía, enfermedad neovascular ocular, enfermedad de Paget, penfigoide, poliarteritis, tras queratotomía radial con láser, neovascularización retiniana, síndrome de Sogrens, colitis ulcerativa, rechazo de injerto, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, edema, ascitis asociada a enfermedades malignas, ictus, angiofibroma y glaucoma neovascular. En una realización, al sujeto se le administra un agente terapéutico que se selecciona de entre el grupo que consiste en un agente anti-neoplásico, un agente quimioterápico y un agente citotóxico.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el sujeto que se va a tratar padece una recaída tras un tratamiento con un antagonista de VEGF o se ha vuelto refractario al tratamiento con antagonistas de VEGF. De acuerdo con otra realización, el sujeto que se va a tratar con un antagonista de alfa5beta1 y un antagonista de VEGF padece un cáncer metastático o se ha tratado anteriormente con terapia adyuvante. En una realización, el paciente candidato ha recaído, es refractario o resistente a agentes terapéuticos tales como irinotecan. Ejemplos de tales enfermedades, incluyen pero no se limitan a, cáncer colorrectal metastático, recidiva de un cáncer colorrectal metastático, cáncer de mama metastático, recidiva de un cáncer de mama metastático, cáncer de mama metastático HER2+, cáncer de mama adyuvante, cáncer de mama HER2+ adyuvante, cáncer pancreático metastático, cáncer de colon adyuvante, cáncer de pulmón de células no pequeñas adyuvante, cáncer rectal adyuvante, cáncer de pulmón de células no pequeñas adyuvante, cáncer de pulmón de células no pequeñas metastático, cáncer ovárico metastático, cáncer de células renales metastático y cáncer de células renales adyuvante.

De acuerdo con una realización, al sujeto que padece una enfermedad descrita en el presente documento se le administra una terapia de mantenimiento tras el tratamiento para una enfermedad con un antagonista de VEGF, en que la terapia de mantenimiento es un antagonista de alfa5beta1 con un antagonista de VEGF.

Como se define en las reivindicaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo anti-VEGF es capaz de inhibirse competitivamente por la unión del VEGF humano al anticuerpo Avastin®. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo anti-VEGF es humano, humanizado o quimérico. De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo anti-VEGF es el anticuerpo Avastin®. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo anti-VEGF s selecciona de entre el grupo que consiste en un fragmento Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv de cadena sencilla (scFv), un Fv; un diacuerpo y un anticuerpo lineal. De acuerdo con otra realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo biespecífico que se une al VEGF y a alfa5beta1 y es un antagonista de alfa5beta1. Como se define en las realizaciones, el antagonista de alfa5beta1 es un anticuerpo. De acuerdo con una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. De acuerdo con una realización más, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico tal como el anticuerpo anti-alfa5beta1 humano conocido como M200 o F200. De acuerdo con una realización, el anticuerpo anti-alfa5beta1 comprende la secuencia de VH SEC ID N° 1 y la secuencia de VL SEC ID N° 2. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo anti-alfa5beta1 comprende la secuencia SEC ID N° 4 y la secuencia SEC ID N° 5. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo anti-alfa5beta1 es capaz de inhibirse competitivamente por la unión al alfa5beta1 humano del anticuerpo 7H5 o el anticuerpo 7H12. De acuerdo con una realización preferida el anticuerpo anti-alfa5beta1 es humano, humanizado o quimérico. De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo anti-alfa5beta1 es el anticuerpo 7H5, el anticuerpo 7H12m i un anticuerpo

quimérico o humanizado del mismo. De acuerdo con otra realización el anticuerpo anti-alfa5beta1 se selecciona de entre el grupo que consiste en un fragmento Fab, Fab', un F(ab)'₂, Fv de cadena sencilla (scFv), un Fv; un diacuerpo y un anticuerpo lineal. De acuerdo con otra realización, el antagonista alfa5beta1 es un anticuerpo biespecífico que se une al VEGF y a alfa5beta1 y es antagonista de VEGF. De acuerdo con otra realización más, el antagonista anti-alfa5beta1 tiene una función efectora alterada. De acuerdo con una realización, un anticuerpo anti-alfa5beta1 se altera para disminuir o evitar la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o de citotoxicidad dependiente del complemento (por ejemplo, alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica la parte Fc del anticuerpo). De acuerdo con otra realización más, el anticuerpo anti-alfa5beta1 se ha alterado para mejorar su semivida en seres humanos (por ejemplo, alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica la parte Fc del anticuerpo).

De acuerdo con una realización, el antagonista de VEGF o el antagonista de alfa5beta1 se conjugan con un agente citotóxico o una agente quimioterápico. De acuerdo con otra realización, el agente citotóxico es un isótopo radioactivo o una toxina.

También se desvelan las composiciones que comprenden antagonista de VEGF, un antagonista alfa5beta1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y artículos de fabricación que comprenden instrucciones para detectar alfa5beta1 en un sujeto que se ha tratado con un antagonista VEGF, al igual que el uso de agonistas VEGFR y agonistas de alfa5beta1 para promover la angiogénesis y la permeabilidad vascular y las composiciones que comprenden agonistas de VEGF y agonistas de alfa5beta1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las terapias de combinación con agonistas de VEGFR y agonistas de alfa5beta1 se pueden utilizar para tratar varias enfermedades que se beneficiarían del aumento de la angiogénesis y la permeabilidad vascular, que incluyen, por ejemplo, curación de heridas tales como en el tratamiento de heridas crónicas, heridas agudas y heridas normales.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un aumento en el reclutamiento de células del estroma que expresan alfa5beta1 tras el tratamiento de tumores HT29 xenoinjertados con el anticuerpo anti-VEGF, B20-4.1.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los anticuerpos 7H5 y 7H12 que se unen a las células HUVEC en un ensayo de unión directa.

La Figura 3 muestra los anticuerpos 7H5 y 7H12 que se unen a células HUVEC pero no a células RAJI por análisis FACS.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la adhesión de HUVEC a la fibronectina en presencia de anticuerpos monoclonales purificados 7H5 y 7H12.

La Figura 5 es (A) un gráfico de barras que muestra el efecto de 7H5 y 7H12 sobre la proliferación de células HUVEC por recuento celular total y (B) un gráfico de barras que muestra el efecto de 7H5 y 7H12 sobre la proliferación de células HUVEC por tinción con Alamar azul en otro ensayo.

La Figura 6 son fotografías de la migración de células HUVEC tras el tratamiento con 7H5 a las 0 h y 30 h comparado con un control negativo (IgG).

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra cuantitativamente la migración de células HUVEC tras el tratamiento con 7H5 y 7H12.

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células HUVEC que expresan caspasa-3 activada en un ensayo tras el tratamiento con 7H5 y 7H12.

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra la actividad de Caspasa 3/7 HUVEC tras el tratamiento con 7H5 y 7H12.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la actividad de 7H12 y Bevacizumab en la herida en la oreja de un modelo de curación en conejo.

La Figura 11 muestra los resultados de ratones tratados con anticuerpo anti-VEGF +/- anticuerpo anti-alfa5beta1 en un modelo de cáncer de mama como (A) un gráfico que muestra el grupo de volumen tumoral medio de los ratones tratados o (B) un gráfico de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de animales que permanece en el estudio en función del tiempo. Los animales se retiraban del estudio cuando sus tumores alcanzaban o excedían los 1500 mm³.

La Figura 12 muestra los resultados de los ratones tratados con un anticuerpo anti-VEGF +/- anticuerpo anti-alfa5beta1 en un modelo de cáncer de colon como (A) un gráfico que muestra el grupo de volumen tumoral medio de los ratones tratados o (B) un gráfico de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de animales que

permanecen en el estudio en función del tiempo. Los animales se retiraban del estudio cuando sus tumores alcanzaban o excedían los 1500 mm³.

La Figura 13 muestra los resultados de ratones tratados con anticuerpo anti-alfa5beta1 o un agente quimioterápico en un modelo de cáncer de colon como (A) un gráfico que muestra el grupo de volumen tumoral medio de los ratones tratados o (B) un gráfico de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de animales que permanece en el estudio en función del tiempo. Los animales se retiraban del estudio cuando sus tumores alcanzaban o excedían los 1500 mm³.

La Figura 14 muestra un gráfico de Scatchard de la unión de ¹²⁵I- 7H5 a alfa5beta1 en R9ab, una línea celular de fibroblastos de conejo.

La Figura 15 muestra un gráfico de Scatchard de la unión de ¹²⁵I- 7H12 a alfa5beta1 en R9ab, una línea celular de fibroblastos de conejo.

La Figura 16 muestra los resultados de los ensayos de mapeo del epítipo IgG alfa5beta1anti-integrina/unión competitiva con varios anticuerpos anti-alfa5beta1.

Descripción detallada de la invención

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los inventores proponen que el aumento de reclutamiento de células del estroma puede traer otros factores de crecimiento vascular a los sitios enfermos que podrían compensar la falta de actividad de VEGF en pacientes tratados con terapias antagonistas de VEGF. La dirección a las células del estroma que expresan a5b1 de un anticuerpo anti-a5b1 puede dar como resultado la reducción de las células del estroma, reduciendo de esta manera la producción de factores de crecimiento vascular potencialmente compensadores. De manera alternativa, o adicionalmente, los inventores proponen que inhibiendo las interacciones de la matriz extracelular-endoteliales, y particularmente inhibiendo las interacciones de unión de alfa5beta1, se potenciarán las terapias con antagonista del VEGF inhibiendo el retorno de la angiogénesis a lo largo de los trayectos que dejaron en la matriz los vasos en regresión debido a la terapia con antagonistas del VEGF. Por lo tanto, el tratamiento con antagonistas de alfa5beta1 concurrentemente o después de cualquier tratamiento con antagonista de VEGF puede inhibir la recuperación de los vasos a partir de ese tratamiento con antagonista VEGF y, en consecuencia, la vuelta del crecimiento neovascular.

“alfa5beta1” o “α5β1” o “a5b1” es una integrina que comprende dos proteínas diferentes (es decir, subunidades alfa5 y beta1). Se ha demostrado que alfa5beta1 se une a la fibronectina, L1-CAM y fibrinógeno. La integrina alfa5beta1 también se ha llamado Activación Muy Tardía-5, VLA-5, alfa5beta1, CD49e/CD29, receptor fibronectina, FNR y GPIIb-IIIa. De acuerdo con una realización preferida, el alfa5beta1 es alfa5beta1 humana.

“Alfa5” también se conoce como CD49e, alfa5, subunidad alfa5 de integrina, subunidad alfa de VLA-5, subunidad IC de GPIIb-IIIa y cadena alfa de FNR tiene cuatro isoformas generadas por corte empalme alternativo (A-D). Estas varían en sus dominios citoplasmáticos. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas humanas de alfa5 se pueden encontrar con, por ejemplo, los números de registro Genbank: X07979, U33879, U33882 y U33880, respectivamente.

“Beta1” también llamada CD29, beta1, GPIIb de plaquetas; cadena beta de VLA, cadena beta-1 de integrina, CD29; FNRB; MDF2; VLAB; GPIIA; MSK12 y VLA5B. Las secuencias de aminoácidos para la Beta1 humana se pueden encontrar, por ejemplo, con el N° de registro Genbank X06256.

El término “VEGF” o “VEGF” como se utiliza en el presente documento se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos y relacionado con factores de crecimiento celular endotelial vascular humanos de 121, 189, y 206 aminoácidos, como describen Leung et al. Science, 246:1306 (1989), y Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas de origen natural y procesadas de los mismos. El término “VEGF” también se refiere a VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primates. Algunas veces el VEGF de una especie específica se indica por términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino, y etc. El término “VEGF” también se utiliza para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF se puede identificar en la presente solicitud, por ejemplo, por “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)” o “VEGF₁₆₅”. Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo “truncado” se numeran como se indica en la secuencia del VEGF nativo. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 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 para los receptores KDR y Flt-1 comparable a la del VEGF nativo. De acuerdo con una realización preferida el VEGF es un VEGF humano.

Un “antagonista de VEGF” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades del VEGF que incluye su unión al VEGF o uno o más receptores de VEGF o el ácido nucleico que los codifica. Preferentemente, el antagonista de VEGF se une a un VEGF o receptor de VEGF. Los

antagonistas de VEGF incluyen los anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígenos de los mismos, polipéptidos que se unen a VEGF y receptores de VEGF y bloquean la interacción ligando-receptor (por ejemplo, inmunoadhesinas, peptidocuerpos), anticuerpos anti-receptor VEGF y antagonistas del receptor VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de la VEGF tirosina quinasas, aptámeros que se unen a VEGF y ácidos nucleicos

5 que se hibridan bajo condiciones rigurosas a secuencias de ácido nucleico que codifican VEGF o receptor de VEGF con una mayor afinidad que un no VEGF o receptor no VEGF. De acuerdo con una realización preferida, el antagonista VEG se une a VEGF o al receptor VEGF con una Kd de entre 1 μ M y pM. De acuerdo con otra realización preferida, el antagonista de VEGF se une a VEGF o a un receptor VEGF entre 500 nM y 1 pM.

10 De acuerdo con una realización preferida, el antagonista de VEGF se selecciona de entre el grupo que consiste en un polipéptido tal como un anticuerpo, un peptidocuerpo, una inmunoadhesina, una molécula pequeña o un aptámero. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF tal como el anticuerpo AVASTIN® o un anticuerpo anti-receptor VEGF tal como un anticuerpo anti-VEGFR2 o anti-VEGFR3. Otros ejemplos de antagonistas de VEGF incluyen: VEGF-Trap, Mucagen, PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (sorafenib), ZD-6474,

15 CP632, CP-547632, AZD-2171, CDP-171, SU-14813, CHIR-258, AEE-788, SB786034, BAY579352, CDP-791, EG-3306, GW-786034, RWJ-417975/CT6758 y KRN-633.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une al VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede utilizar como un agente terapéutico en la

20 dirección e interferencia con enfermedades y afecciones en las que está implicada la actividad del VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos del VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF, o bFGF. Un anticuerpo anti-VEGF preferido es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por hibridoma ATCC HB10709. Más preferentemente el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado

25 recombinante generado de acuerdo con Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599, que incluye pero no se limita al anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin®). De acuerdo con otra realización, los anticuerpos anti-VEGF que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos desvelados en el documento WO 2005/12359. De acuerdo con una realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende la región variable pesada y variable ligera de uno cualquiera de los anticuerpos desvelados en las Figuras 24, 25, 26, 27 y 29 del documento

30 WO 2005/12359 (por ejemplo, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 y B20.4.1). En otra realización preferida, el anticuerpo conocido como ranibizumab es el antagonista que se administra para la enfermedad ocular tal como la neuropatía diabética y AMD.

El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "Avastin®", es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta et al. (1997) Cancer

35 Res. 57:4593-4599. Comprende regiones mutadas de la estructura de IgG1 humana y regiones determinantes de complementariedad de unión al antígeno do anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos del Bevacizumab, incluyendo las mayoría de las regiones de estructura, se derivan de la IgG1 humana, y aproximadamente el 7 % de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1. El Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 y está glucosilado. Otros anticuerpos anti-VEGF incluyen los anticuerpos descritos en la

40 Patente de Estados Unidos N° 6884879 y el documento WO 2005/044853.

El anticuerpo anti-VEGF Ranibizumab o el anticuerpo LUCENTIS® o rhuFab V2 es un fragmento Fab anti-VEGF humano maduro de afinidad humanizada. El Ranibizumab se produce por métodos de tecnología recombinante de

45 referencia en un vector de expresión de Escherichia coli y fermentación bacteriana. El Ranibizumab no está glucosilado y tiene una masa molecular de ~ 48.000 daltons. Véase los documentos WO98/45331 y US20030190317.

"Antagonista Alfa5Beta1" se refiere a cualquier molécula que inhibe la actividad biológica de alfa5beta1. De acuerdo con una realización preferida, la molécula antagonista se une específicamente a alfa5beta1. De acuerdo con una realización preferida, la molécula antagonista se une a alfa5. De acuerdo con una realización preferida, un antagonista de alfa5beta1 preferentemente se une a alfa5beta1 con mayor afinidad con respecto a una integrina no

50 alfa5beta1. De acuerdo con una realización preferida, el antagonista se selecciona de entre el grupo que consiste en un polipéptido tal como un anticuerpo, un peptidocuerpo o una inmunoadhesina, una molécula pequeña o un aptámero que inhibe la unión de alfa5beta1 a su ligando (particularmente, la fibronectina) o un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que codifica alfa5beta1 (por ejemplo un ARNi que interfiere con la expresión de alfa5). Una actividad biológica de alfa5beta1 puede ser cualquiera de uno, la combinación o todos los efectos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en (1) la unión a la fibronectina,

60 (2) aumento de la migración celular sobre la fibronectina, (3) aumento de la supervivencia de células que comprenden alfa5beta1 en presencia de fibronectina, (4) aumento de proliferación de células que comprenden alfa5beta1 en presencia de fibronectina, y (5) aumento de la formación de tubos de las células que comprenden alfa5beta1 en presenciad de fibronectina.

Ejemplos de anticuerpo antagonistas anti- alfa5beta1 incluyen M200 y F200 (documento WO 2004/089988A2), el anticuerpo 7H5 y el anticuerpo 7H12 descritos en el presente documento, y anticuerpos quiméricos, completamente

humanos y humanizados de los mismos. Por ejemplo los anticuerpos M200 y F200 se pueden derivar de las cadenas pesada variable y ligera variable del anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ humana de ratón, IIA1 (Pharmingen, San Diego, Ca). Ejemplos de inhibidores de molécula pequeña de $\alpha 5\beta 1$ incluyen Ac-PHSCN-NH₂ (documento WO-9822617A1) y (S)-2-[(2,4,6-trimetilfenil)sulfonil]amino-3-[7-benziloxicarbonil-8-(2-piridinilamino metil)-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-en-3-il] carbonilamino] ácido propiónico. De acuerdo con una realización preferida, el antagonista anti- $\alpha 5\beta 1$ se une a $\alpha 5\beta 1$ y a $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$ o $\alpha V\beta 1$. De acuerdo con una realización preferida los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ se unen a $\alpha 5\beta 1$ con una K_d de entre 1 uM y 1 pM. De acuerdo con otra realización preferida, el antagonista de $\alpha 5\beta 1$ se une a $\alpha 5$ con una K_d de entre 500 nM y 1 pM. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo $\alpha 5\beta 1$ es un anticuerpo que compite con el anticuerpo 7H5 o el anticuerpo 7H 12 por la unión a $\alpha 5\beta 1$ en un ensayo de unión competitiva. De acuerdo con otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo que puede inhibirse competitivamente de la unión con $\alpha 5\beta 1$ por el anticuerpo producido por el hibridoma depositado como Alpha5/ $\beta 1$ 7H5.4.2.8 (ATCC N° PTA-7421) o el hibridoma depositado como Alpha5/ $\beta 1$ 7H12.5.1.4 (ATCC N° PTA-7420) el 7 de marzo de 2006.

“Agonista VEGFR” se refiere a una molécula que puede activar un receptor VEGF o aumenta su expresión. Los agonistas de VEGFR incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, ligandos agonistas de un VEGFR, variantes de VEGF, anticuerpos y fragmentos activos.

“Agonistas de $\alpha 5\beta 1$ ” se refiere a una molécula que puede activar la $\alpha 5\beta 1$ o aumentar su expresión. Los agonistas de $\alpha 5\beta 1$ incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ligandos agonistas de $\alpha 5\beta 1$.

Las moléculas, tal como anticuerpos, que se caracterizan por unirse al solapamiento o áreas similares en una diana se pueden identificar por ensayos de unión/inhibición competitiva.

En una realización, se utilizan HUVEC u otras células que expresan $\alpha 5\beta 1$ en un ensayo de inhibición competitiva y se utiliza FACS para evaluar las localidades de unión de dos anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ uno respecto al otro. Por ejemplo, se pueden lavar las células HUVEC en un tubo cónico y centrifugarlo 5 min @ 1000 rpm. El aglomerado se lava normalmente dos veces. Luego, se pueden resuspender las células, contarlas y mantenerlas en hielo hasta que se utilicen. Se pueden añadir al pocillo 100 μ l de un primer anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (por ejemplo comenzando a una concentración de 1 μ g/ml o una concentración más baja). Luego se pueden añadir 100 μ l de células (por ejemplo, 20 x 10⁵ células) por pocillo y se incuban en hielo durante 30 min. Después, se pueden añadir 100 μ l de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ biotinilado (solución madre 5 μ g/ml) a cada pocillo e incubarse en hielo durante 30 min. Las células se lavan y se aglomeran durante 5 min @ 1000 rpm. El sobrenadante se aspira. Un 2º anticuerpo con estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (Jackson 016-110-084) se añade al pocillo (100 μ l @ 1:1000). Después, la placa se envuelve en una hoja y se incuba en hielo durante 30 min. Después de la incubación se puede lavar el aglomerado y se aglomera 5 min. @ 1000 rpm. El aglomerado se puede resuspender y transferir a micro tubos de titulación para el análisis FACS.

Un “factor o agente angiogénico” es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento celular endotelial, estabilidad de vasos sanguíneos, y/o vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia VEGF, PlGF, familia PDGF, familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos TIE (Angiopoyetinas), efrinas, Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos: ácido (aFGF) y básico (bFGF), Folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor scatter (SF), interleucina-8 (IL-8), Leptina, Midquina, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, Pleiotrofina (PTN), Piogranulina, Proliferina, Factor de crecimiento transformante-alfa (TGF-alfa), Factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/Factor de permeabilidad vascular (VPF), etc. Se deberían también incluir factores que aceleran la curación de heridas, tales como hormona de crecimiento, factor de crecimiento 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, Annu. Rev. Physiol, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, Tabla 1 que enumera factores angiogénicos conocidos); y, Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003).

La “K_d” o “valor de K_d” para un anticuerpo anti-VEGF de acuerdo con la presente invención se mide en una realización preferida por un ensayo de unión de un VEGF radiomarcado (RIA) que se realiza con la versión Fab de un anticuerpo y una molécula de VEGF como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab para el VEGF equilibrando el Fab con una concentración mínima de VEGF(109) marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulación de VEGF sin marcar, capturando luego el VEGF unido en una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, se revistieron placas microtitrer (Dynex) durante una noche con 5 μ g/ml de anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6), y posteriormente se bloqueó con un 2 % (p/v) de albúmina sérica bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n° 2696620), se mezclaron 100 pM o 26 pM de [¹²⁵I]VEGF(109) con diluciones seriadas del Fab

de interés, por ejemplo, Fab-12 (Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incubaba entonces una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante 65 horas para asegurar que se alcance el equilibrio. A partir de entonces, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. Se retira entonces la solución y la placa se lava ocho veces con un 0,1 % de Tween-20 en PBS. Cuando las placas están secas, se añaden 150 μ l/pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador Topcount gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de Fab que dan menos de o igual al 20 % de la unión máxima se escogen 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 utilizando ensayos de resonancia de plasmones de superficie utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con hVEGF (8-109) inmovilizado en chips CM5 a ~ 10 unidades de respuesta (RU). En resumen, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con hidrócloruro de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del suministrador. El VEGF humano se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, en 5 μ g/ml (~ 0,2 μ M) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5 μ l/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de VEGF humano, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos que no reaccionaron. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones de dos veces en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con un 0,05 % de Tween 20 (PBST) a 25 °C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 μ l/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo de unión Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como la relación entre k_{off}/k_{on} . Véase por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la tasa-on excede a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces se puede determinar la tasa-on utilizando una técnica de apagado fluorescente que mide el aumento o descenso en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de banda de paso) a 25 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-VEGF (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de la forma corta de VEGF humano (8-109) o VEGF de ratón que se mide en una espectrofotómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un Espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitador. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión similares para determinar la K_d de un Fab anti-alfa5beta1 o antibiótico que usa la alfa5beta1 como diana.

Como se utiliza en el presente documento, un sujeto que se va a tratar es un mamífero (por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, rata, ratón, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, etc.). El sujeto puede ser un paciente clínico, un voluntario de un ensayo clínico, un animal de experimentación, etc. El sujeto puede ser sospechoso de tener o de estar en riesgo de tener un cáncer, una enfermedad inmunitaria, o cualquier otra enfermedad que tiene angiogénesis excesiva, ser diagnosticado de cáncer, enfermedad inmunitaria, o cualquier otra enfermedad que tiene excesiva angiogénesis. Muchos métodos de diagnóstico para el cáncer, enfermedad inmunitaria o cualquier otra enfermedad que muestra angiogénesis anormal y la delineación clínica de esas enfermedades se conocen en la técnica. De acuerdo con una realización preferida, el sujeto que se va a tratar de acuerdo con la presente invención es un ser humano.

La expresión angiogénesis anormal se produce cuando los nuevos vasos sanguíneos crecen o excesivamente o inapropiadamente (por ejemplo, la localización, el momento o la aparición de la angiogénesis no es la deseada desde un punto de vista médico) en un estado de enfermedad o tal que produce un estado de enfermedad. La angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada se produce cuando hay un nuevo crecimiento de vasos sanguíneos que contribuye al empeoramiento del estado de enfermedad o produce un estado de enfermedad, tal como en el cáncer, especialmente los tumores sólidos vascularizados y los tumores metastáticos (incluyendo el cáncer de colon, pulmón (especialmente el cáncer de pulmón de células pequeñas), o el cáncer de próstata), enfermedades producidas por neovascularización ocular, especialmente la ceguera diabética, retinopatías, retinopatía diabética primaria o degeneración macular inducida por la edad, neovascularización coroidal (CNV), edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena retiniana central (CRVO), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, y rubeosis; psoriasis y artritis psoriásica, hemangioblastoma tal como el hemangioma; enfermedades inflamatorias renales, tales como glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética o nefrosclerosis hipertensiva; varias enfermedades inflamatorias, tales como artritis, especialmente artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, sarcoidosis, arterioesclerosis arterial y enfermedades que se producen después de un trasplante, endometriosis o asma crónica y más de otras 70 afecciones. Los nuevos vasos sanguíneos pueden alimentar los tejidos enfermos, destruir los tejidos normales, y en el caso del cáncer, los nuevos vasos pueden permitir que las células tumorales escapen por la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis tumoral). La presente invención contempla el tratamiento de estos pacientes que están en riesgo de desarrollar las enfermedades mencionadas anteriormente.

Otros pacientes que son candidatos a recibir los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención tienen, o están en riesgo de desarrollar, proliferación anormal de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de deficiencia inmunitaria adquirida, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Bechets, tumores que cargan sangre, enfermedad carotídea obstructiva, neovascularización coroidal, inflamación crónica, desprendimiento de retina crónica, uveítis crónica, vitritis crónica, sobreuso de lentes de contacto, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales,

- queratoconjuntivitis epidérmica, úlceras fúngicas, infecciones de Herpes Simple, infecciones de Herpes Zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración lipídica, enfermedad de Lyme, queratolisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones por Micobacterias distintas de la lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, fosas ópticas, síndrome de Osler-Weber (Osler-Weber-Rendu), osteoartritis, enfermedad de
- 5 Paget, pars planitis, penfigoide, flictenulosis, poliartritis, complicaciones tras láser, infecciones por protozoos, pseudoxantoma elástico, pterigio, queratitis seca, queratotomía radial, neovascularización retiniana, retinopatía del prematuro, fibroplasias retrolenticulares, sarcoide, escleritis, anemia de células falciformes, síndrome de Sogrens, tumores sólidos, enfermedad de Stargarts, enfermedad de Steven Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus
- 10 sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, traumatismos, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rhabdomyosarcoma, colitis ulcerativa, oclusión venosa, deficiencia de vitamina A y sarcoidosis de Wegener, angiogénesis no deseada asociada con diabetes, enfermedades parasitarias, curación anormal de heridas, hipertrofia tras una cirugía, lesiones o traumatismos, inhibición del crecimiento del pelo.
- 15 Las terapias anti-angiogénicas son útiles en el tratamiento general del rechazo de injertos, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, derrame pericárdico, tales como las que se asocian con pericarditis, y derrame pleural, enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular no deseada, por ejemplo, edema asociado con tumores cerebrales, ascitis asociadas con enfermedades malignas, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, derrame pericárdico, derrame pleural, permeabilidad asociada con enfermedades
- 20 vasculares tales como la afección tras los infartos de miocardio e ictus y similares.
- Otras enfermedades dependientes de la angiogénesis de acuerdo con la presente invención incluyen angiofibroma (anormalidad de los vasos sanguíneos que son proclives a sangrar), glaucoma neovascular (crecimiento de vasos sanguíneos en el ojo), malformaciones arteriovenosas (comunicación anormal entre arterias y venas), no unión de
- 25 fracturas (fracturas que no curarán), placas ateroscleróticas (endurecimiento de las arterias), granuloma piogénico (lesión cutánea común compuesta de vasos sanguíneos), escleroderma (una forma de enfermedad del tejido conjuntivo), hemangioma (tumor compuesto de vasos sanguíneos), tracoma (primera causa de ceguera en el tercer mundo), articulaciones del hemofílico, adhesiones vasculares y escaras hipertróficas (formación anormal de escaras).
- 30 “Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas y preventivas. Aquellos que tienen necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los que el trastorno se va a prevenir.
- Los términos “recurrencia”, “recaer” o “recaída” se refiere a la vuelta de un cáncer o enfermedad tras la evaluación
- 35 clínica de la desaparición de la enfermedad. Un diagnóstico de metástasis distante o recurrencia local se puede considerar una recaída.
- El término “refractario” o “resistente” se refiere a un cáncer o enfermedad que no ha respondido al tratamiento.
- 40 La expresión “terapia adyuvante” se refiere al tratamiento que se da tras la terapia primaria, habitualmente la cirugía. La terapia adyuvante para el cáncer o enfermedad puede incluir terapia inmunitaria, quimioterapia, radioterapia o terapia hormonal.
- La expresión “terapia de mantenimiento” se refiere al re-tratamiento programado que se da para ayudar a mantener
- 45 los efectos de un tratamiento previo. La terapia de mantenimiento a menudo se da para ayudar a mantener el cáncer en remisión o prolongar una respuesta a una terapia específica independientemente de la progresión de la enfermedad.
- La expresión “cáncer invasivo” se refiere a un cáncer que se ha diseminado más allá de la capa de tejido en el que
- 50 empezó en los tejidos normales circundantes. Los cánceres invasivos pueden ser metastáticos o no.
- La expresión “cáncer no invasivo” se refiere a un cáncer muy temprano o un cáncer que no se ha diseminado más allá del tejido de origen.
- 55 La expresión “supervivencia libre de progresión” en oncología se refiere a la duración del tiempo durante y después del tratamiento que un cáncer no crece. La supervivencia libre de progresión incluye la cantidad de tiempo en que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en que los pacientes experimentan una enfermedad estable.
- 60 La expresión “enfermedad progresiva” en oncología se puede referir a un crecimiento tumoral de más del 20 por ciento desde que empieza el tratamiento - sea debido a un aumento de la masa o a una diseminación del tumor.
- Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Por ejemplo, los
- 65 mamíferos que padecen o necesitan profilaxis contra la angiogénesis anormal (angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada) o permeabilidad vascular. Esto incluye los trastornos o enfermedades agudas que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos

que se van a tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos, enfermedades malignas no leucemias y linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrófagos, epiteliales, del estroma y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

- 5 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular sin regulación. Ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón que incluye el cáncer de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), cáncer de próstata, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo el cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecomas, arrenoblastomas, hepatoma, enfermedades malignas hematológicas que incluyen linfoma no Hodgkin (NHL), mieloma múltiple y enfermedades malignas hematológicas agudas, carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de glándula salivar, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, Shwannoma, oligodendroglioma, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas tiroideos, tumor de Wilm, así como linfoma de células B (incluyendo el linfoma no Hodgkin folicular/de bajo grado (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL), NHL folicular/de grado intermedio; NHL intermedio de grado difuso; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado; NHL de enfermedad masiva; linfoma de células en mantel; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; trastorno linfoproliferativo tras un trasplante (PTLD), así como proliferación vascular asociada con facomatosis, y síndrome de Meigs.

- 30 “Tumor”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, tanto maligno como benigno, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

- La expresión “composición anti-neoplásica” o “agente anti-neoplásico” se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, “agente anti-cáncer”. Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anti-cáncer) incluyen, pero no se limita a, por ejemplo, agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes que se usan en radioterapia, agentes anti-angiogénicos, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, y otros agentes para tratar el 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 la tirosina quinasa), inhibidor HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BAFF, BR3, APRIL, BCMA o receptor(es) VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos, etc. Las combinaciones de los mismos también se contemplan en la presente invención.

- 45 Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una células in vitro y/o in vivo. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser el que reduce significativamente el porcentajes de células en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluye agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención en fase M. Los bloqueadores clásicos de fase M incluyen derivados de la vinca (vincristina y vinblastina), TAXOL®, e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la p. 13.

- La expresión “agente citotóxico” como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterápicos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

- Un “agente quimioterápico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como Tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocona, meturedopa, y uredopa; etilniminas y metilmelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una

camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocanicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; spongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enedina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma I y calicheamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, que incluyen la dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como neocarzinostatina cromóforo y cromoproteínas antibióticos enedinas cromóforos relacionados), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, canninomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMICINA® (que incluye morfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxirubicina), epirubicina, zorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, negalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purinas tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidinas tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicon; eflomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucida; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxín; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicon; 2,2',2''-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, rorina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitósido; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), A13RAXANETM libre de Cromóforo, formulación de paclitaxel en nanopartículas de albúmina modificada (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el regimen de tratamiento de irinotecan con 5-FU y leucovorín); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico; capecitabina; combrestatina; leucovorín (LV); oxaliplatino, incluyendo el regimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores del PKC-alfa, Raf, H-Ras y EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva TM)) que reduce la proliferación y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la presente definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre los tumores tales como los anti-estrógenos y los moduladores del receptor selectivo de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, troxifeno, keofixeno, LY117018, onapristona, y FARESTON toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, fonestania, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido citosina 1,3-dioxolano); 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 inhibidor de expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZIME®) e inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa I LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelbina y esperamicina (véase la Pat. de EE. UU. N° 4.675.187), y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco" como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa (por ejemplo, una molécula pequeña) que es menos citotóxica para las células enfermas en comparación con el fármaco parental y que es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transaction, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluye, pero no se limita a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiófosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados de D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactamos, profármacos que

contienen fenoxiacetamida sustituida opcionalmente o profármacos que contienen fenilacetamida sustituida opcionalmente, profármacos 5-fluorocitosina y otras 5-fluorouridinas que se pueden convertir en el fármaco citotóxico libre más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivar en forma de profármaco para el uso en la presente invención incluyen, por no se limitan a, los agentes quimioterápicos descritos anteriormente.

“Aislado”, cuando se utiliza para describir los distintos polipéptidos desvelados en el presente documento, significa el polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de una células o cultivo celular a partir de la cual se expresaba. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían normalmente con el diagnóstico y usos terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia del extremo N o la secuencia interna por el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (2) por homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido in situ en células recombinantes, siempre que no esté presente al menos un componente del entorno natural del polipéptido. De manera habitual, sin embargo, el péptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido “aislado” o un ácido nucleico que codifica otro polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con el que está habitualmente asociado en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado es distinto del de la forma o grupo en el que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico que codifica el polipéptido aislado por lo tanto se distingue de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido específico que existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislado incluye las moléculas de ácido nucleico que codifica el polipéptido que están contenidas en células que habitualmente expresan el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente que la de las células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y amplificadores.

El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una pre-secuencia o directora de secreción está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o amplificador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionada de manera que facilita la traducción. En general, “unida operativamente” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de una directora de secreción, contigua y en fase de lectura. Sin embargo los amplificadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue por unión en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores o enlazadores sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

“Condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se definen en el presente documento, se pueden identificar por aquellas que: (1) emplean bajo fuerza iónica y alta temperatura en el lavado, por ejemplo 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato sódico/0,1 % de dodecil sulfato sódico a 50 °C; (2) empleo durante la hibridación de un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, un 50 % (v/v) de formamida con 0,1 % de albúmina sérica bovina/0,1 % Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato sódico a pH 6,5 con 750 mM de citrato sódico a 42 °C; o (3) hibridación durante una noche en una solución que emplea un 50 % de formamida, 5 x de SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato sódico), 50 mM de fosfato sódico (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato sódico, 5 x de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1 % de SDS, y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, con un lavado de 10 minutos a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido por un lavado de 10 minutos de lavado a alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

“Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en el presente documento se definen como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos del polipéptido con el que se compara, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar cualquiera de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, utilizando software de computadora disponible públicamente tales como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo que se necesite para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencias se generan utilizando el programa de computadora de comparación de secuencias ALIGN-2. El autor del programa de computadora de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc. y el código fuente (Tabla 1) se ha

presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Copyright de EE. UU., Washington D. C., 20559, donde se registró bajo el registro de Copyright de EE. UU. N° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente por medio de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se tiene que recopilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente el UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan al programa ALIGN-2 y no varían.

Las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento son secuencias de aminoácidos contiguas a menos de que se especifique otra cosa.

Como se utiliza en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de una inmunoglobulina. La adhesina que es parte de una molécula inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión a un receptor o un ligando - tal como un VEGFR o un ligando fibronectina. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (que incluyen la IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD, o IgM. Los peptidocitos, que a menudo comprenden una secuencia derivada de selección por fago de presentación de secuencias que se unen específicamente a una diana fusionadas con una parte Fc de una inmunoglobulina, pueden considerarse en el presente documento como inmunoadhesinas.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales sencillos (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anti-anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpo (véase posteriormente) siempre que se unan específicamente a un polipéptido nativo y/o muestren una actividad biológica o una actividad inmunológica de la presente invención. De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une a una forma oligomérica de la proteína diana, por ejemplo, una forma trimérica. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una proteína, cuya unión puede inhibirse por un anticuerpo monoclonal de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo depositado de la presente invención, etc.). La frase "fragmento o análogo funcional" de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo al que se ha referido. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo de la presente invención puede ser uno que se puede unir específicamente a VEGF o a alfa5beta1. En una realización, el anticuerpo puede evitar o reducir sustancialmente la capacidad de un VEGF para inducir la proliferación celular.

Un "anticuerpo aislado" es el que se ha identificado y separado y/o se ha recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes de este entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se puede purificar (1) hasta más del 95 % por peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % por peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna con el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reductoras utilizando azul Coomassie o hasta que no esté presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en las células recombinantes siempre que no esté presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

La unidad básica de 4-cadenas de un anticuerpo es una glucoproteína heterotetramérica de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades básicas heterotetraméricas junto con un péptido adicional llamado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA segregados se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden, 2-5 de las unidades básicas de 4-cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a la cadena H con un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre ellas por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante (C_L) en el otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L está mal alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que restos aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena pesada y ligera. El emparejamiento de una V_H y una V_L juntos forman un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y propiedades de las distintas clases de anticuerpos, véase Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas que se designan α , δ , γ , ϵ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen en subclases basándose en diferencias relativamente menores de la secuencia de C_H y función, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del intervalo de 110 aminoácidos de los dominios variables. Por el contrario, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones de estructura (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables", que tienen cada una una longitud de 9-12 aminoácidos. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una cuatro FR, adoptando sobre todo una configuración de láminas beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos formando parte de, la estructura en láminas beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de los anticuerpos al antígeno (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor aproximadamente de los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L , y alrededor de aproximadamente 31-3513 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H (en una realización, H1 es alrededor de aproximadamente 31 a 35); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L , y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H ; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades mínimas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes que se dirigen contra diferentes determinantes antigénicos (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos por que pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" no se tiene que concebir como que se necesita producir al anticuerpo por un método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden preparar por metodología de hibridoma descrita por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se puede hacer utilizando métodos de ADN recombinante en bacterias eucariotas, células animales o vegetales (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 4.186.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991), Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), y los Ejemplos posteriores, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga con las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica con o homóloga a secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren una actividad biológica de la presente invención (véase la Patente de EE. UU. N° 4.816.567, y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primitizados", que comprenden secuencias del dominio variable de unión al antígeno derivadas de un primate no-humano (por ejemplo, monos del viejo mundo, simios, etc.), y secuencias de la región constante humana.

Un anticuerpo "intacto" es el que comprende un sitio de unión al antígeno así como un C_L y al menos los dominios de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser secuencias nativas de dominios constantes (por ejemplo, secuencias nativas de dominios constantes humanos) o una variante de secuencia de aminoácidos de las mismas. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

“Fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', un F(ab)₂, y Fv; un diacuerpo y anticuerpos lineales (véase la Patente de EE. UU. Nº 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Ends*, 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpo.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par en tándem de segmentos Fd (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con los polipéptidos de complementariedad de cadena ligera, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, y un fragmento “Fc” residual, una denominación que refleja la capacidad de cristalizar rápidamente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Dado que un fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da como resultado un fragmento sencillo grande F(ab)₂ que corresponde aproximadamente a los dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión al antígeno divalente y aún es capaz de entrecruzamiento con el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por tener unos cuantos restos adicionales en el extremo carboxilo del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región de bisagra. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en que el resto(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab)₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de la bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones del extremo carboxilo de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias de la región Fc, cuya región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión al antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de dominio de región variable de cadena ligera y de cadena pesada en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren la especificidad de unión del anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o medio de un Fv que comprenda solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

“Fv de cadena sencilla” también abreviado como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que capacita al sFv para formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo que se preparan construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L tal que se consigue un emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, lo que resulta en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “de cruce” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en cadenas polipeptídicas diferentes. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En otros casos, los restos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar más la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas o al menos una, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de inmunoglobulina humana.

Para más detalles, véase 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).

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

En tales realizaciones, la extensión de unión del polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición a una proteína "no diana" será menor de aproximadamente el 10 % de la unión del polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición a su proteína diana particular como se determina por clasificación celular activada por análisis de fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición a la molécula diana, la expresión "unión específica" o "unido específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo o una diana polipeptídica particular significa una unión que es medible como diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar por competición con una molécula control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente por un exceso de diana sin marcar. La expresión "unión específica" o "unido específicamente a" o "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular como se utiliza en el presente documento se puede mostrar, por ejemplo, por una molécula que tiene una Kd para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M, o más. En una realización, la expresión "unión específica" se refiere a la unión en que una molécula se une a un polipéptido particular o un epítipo de un polipéptido particular sin que se una sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de un polipéptido.

"Funciones efectoras" de anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a una región Fc (una secuencia de la región Fc nativa o una secuencia de aminoácidos de la región Fc variante) de un anticuerpo, y varía con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: la unión Clq y citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celulares; y activación de células B. Una "secuencia nativa de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se encuentre en la naturaleza. Ejemplos de secuencias de Fc se describen en, por ejemplo, pero sin limitarse a, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una secuencia de región Fc nativa gracias al menos a una "modificación de aminoácido" como se define en el presente documento. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la secuencia Fc nativa o la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, desde aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente desde aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una secuencia de una región Fc nativa o en la región Fc de un polipéptido parental. En una realización, la región Fc variante del presente documento tendrá una homología de al menos aproximadamente el 80 %, una homología de al menos aproximadamente el 85 %, una homología de al menos aproximadamente el 90 %, una homología de al menos aproximadamente el 95 %, una homología de al menos aproximadamente el 99 % con la secuencia de una región Fc nativa. De acuerdo con otra realización, la región Fc variante del presente documento tiene una homología de al menos aproximadamente el 80 %, una homología de al menos aproximadamente el 85 %, una homología de al menos aproximadamente el 90 %, una homología de al menos aproximadamente el 95 %, una homología de al menos aproximadamente el 99 % con una región Fc de un polipéptido parental.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" o "homología" con respecto a las secuencias del polipéptido y anticuerpo que se identifican en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticas a los restos de aminoácidos en el polipéptido con el que se compara, tras el alineamiento de las secuencias considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir por varias maneras que están en la experiencia de la técnica, por ejemplo,

utilizando los softwares de computadora disponibles públicamente tales como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente los parámetros para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se van a medir. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan utilizando el programa de computadora de comparación de secuencias ALIGN-2. El autor del programa de computadora de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc. y el código fuente se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Copyright de EE. UU., Washington D. C., 20559, donde se registró bajo el registro de Copyright de EE. UU. N° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente por medio de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se tiene que recopilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente el UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan al programa ALIGN-2 y no varían.

La expresión "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (véase la definición posteriormente), que comprende una región Fc. La lisina del extremo C (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o modificando recombinantemente el ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende polipéptidos, incluyendo anticuerpos, que tienen una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender poblaciones de polipéptidos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones sin eliminación de restos K447 o poblaciones de polipéptidos que tienen una mezcla de polipéptidos con y sin resto K447.

A lo largo de la presente especificación y las reivindicaciones, el sistema de numeración Kabat se utiliza generalmente se utiliza cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente, 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" generalmente se utiliza cuando se hace referencia a un resto en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU comunicado en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). A menos de que se establezca otra cosa en el presente documento, las referencias a los números de restos en los dominios variables de los anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración de Kabat. A menos de que se establezca otra cosa en el presente documento, las referencias a los números de restos del dominio constante de anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración EU.

Las expresiones "receptor Fc" o "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una realización, un FcR de la presente invención es el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian primariamente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo inmunorreceptor de inhibición basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático, (véase una revisión en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). El término incluye alotipos, tales como los alotipos de FcγRIIIA: FcγRIIIA-Phe158, FcγRIIIA-Val158, FcγRIIA-R131 y/o FcγRIIA-H131. Los FcR se revisan 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, incluidos los que se identificarán en un futuro, se engloban en el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El término "FcRn" se refiere al receptor Fc neonatal (FcRn). El FcRn es similar estructuralmente al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y consiste en una cadena α unida no covalentemente a una β2-microglobulina. Las múltiples funciones del receptor Fc neonatal FcRn se revisan en Ghetie y Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766. El FcRn tiene un papel en el suministro pasivo de inmunoglobulinas IgG de la madre al hijo y la regulación de los niveles séricos de IgG. El FcRn puede actuar como un receptor silvestre, uniéndose y transportando IgG de pinocitosis en forma intacta tanto en como a través de las células, y rescatándolas a partir de una ruta de degradación por defecto.

El documento WO00/42072 (Presta) y Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) describen variantes de anticuerpos con uniones mejoradas o disminuidas a los FcR.

El "dominio CH1" de una región Fc de IgG humana (también denominada "C1" o "H1") habitualmente se extiende desde aproximadamente el aminoácido 118 hasta aproximadamente el aminoácido 215 (sistema de numeración EU).

"Región bisagra" se define en general como el tramo desde la Glu216 a Pro230 de la IgG1 (Burton, *Molec. Immunol.*

22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 para localizar el primero y el último resto de cisteína que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

- 5 La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de restos de la región bisagra inmediato hacia el extremo C, es decir, los restos 233 a 239 de la región Fc. En informes anteriores, la unión de FcR se atribuía generalmente a los restos de aminoácidos de la región bisagra inferior de una región Fc de IgG.

- 10 El "dominio CH2" de la región Fc de IgG humana (también llamado dominio "C2" o "H2") se extiende habitualmente desde aproximadamente el aminoácido 231 a aproximadamente el aminoácido 340. El dominio CH2 es único en que no está emparejado estrechamente con otro dominio. Más bien, hay dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa. Se ha especulado sobre si el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayuda a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985).

- 15 El "dominio CH3" (también llamado "C3" o "H3") comprende el tramo de restos hacia el extremo C de un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde el resto de aminoácido 341 hacia el extremo C de una secuencia de anticuerpo, normalmente hasta el resto de aminoácido 446 o 447 de una IgG).

- 20 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de la secuencia de la región Fc nativa. "Funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores celulares de membrana (por ejemplo el receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras necesitan generalmente de que la región Fc esté combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos como se desvela en el presente documento, por ejemplo.

- 30 "C1q" es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. El C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente de la ruta de la toxicidad dependiente de complemento (CDC). El C1q humano se puede obtener comercialmente en, por ejemplo, Quidcl, San Diego, CA.

- La expresión "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una parte de una cadena polipeptídica del mismo (por ejemplo la cadena alfa del mismo) que es responsable de la unión a una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena alfa de FcR.

- 35 Un anticuerpo o peptidocuerpo con una Fc de IgG variante con afinidad de unión a FcR "alterada" o actividad ADCC es el que tiene o aumentada o disminuida la actividad de unión a FcR (por ejemplo, FcγR o FcRn) y/o la actividad ADCC en comparación con un polipéptido parental o polipéptido que contiene una secuencia de región Fc nativa. La variante de Fc que "muestra un aumento de unión" para FcR se une al menos a un FcR con afinidad más alta (por ejemplo, Kd o valor de CI50 aparentemente más bajas) que el polipéptido parental o las secuencia Fc de IgG nativa. De acuerdo con algunas realizaciones, la mejoría en la unión en comparación con un polipéptido parental es aproximadamente de 3 veces, preferentemente aproximadamente 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, hasta 500 veces, o una mejoría de aproximadamente el 25 % al 1000 % de la unión. El polipéptido variante que "muestra una disminución de la unión" para un FcR, se une al menos a un FcR con afinidad menor (por ejemplo, Kd aparentemente mayor o valor de CI50 más alto) que el polipéptido parental. La disminución de la unión en comparación con un polipéptido parental puede ser aproximadamente del 40 % o más de descenso de la unión.

- 50 "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada se une a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo células citolíticas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) capacitando estas células efectoras citotóxicas para unirse específicamente a una célula diana que tiene el antígeno y posteriormente destruir la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citolíticas y son absolutamente necesarios para tal destrucción. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo ADCC in vitro, tal como el que se describe en la Patente de EE. UU. Nº 5.500.362 o 5.821.337 o en los ejemplos posteriores. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). De manera alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se describe en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

- 65 El polipéptido comprende una región Fc variante que "muestra un aumento de ADCC" o media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en presencia de células efectoras más eficazmente que un polipéptido que tiene la Fc de IgG tipo silvestre o un polipéptido parental es el que es sustancialmente más eficaz in vitro o in vivo en la mediación de ADCC, cuando las cantidades de polipéptido con la región Fc variante y el polipéptido con la región Fc tipo silvestre (o el polipéptido parental) en el ensayo son esencialmente las mismas. En

general, tales variantes se identificarán utilizando el ensayo ADCC in vitro como se desvela en el presente documento, aunque se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la actividad ADCC, por ejemplo, en un modelo animal, etc. En una realización, la variante preferida es desde aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo, desde aproximadamente 25 veces a aproximadamente 50 veces, más eficaces en la mediación de ADCC que el Fc tipo silvestre (o polipéptido parental).

“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 por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno semejante, Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Los polipéptidos variantes con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q se describen en la Patente de EE. UU. Nº 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y que realizan funciones efectoras. De acuerdo con una realización, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo una función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluye las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo las PBMC y las células NK las preferidas. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de la sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

Los métodos de medición de la unión al FcRn se conocen (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004) así como los descritos en los Ejemplos posteriormente. Se puede ensayar la unión a FcRn humano in vivo y la semivida sérica de polipéptidos que se unen con alta afinidad al FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o en líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos Fc variantes. En una realización, específicamente los anticuerpos anti-alfa5beta1 de la invención tienen una Fc de IgG variante muestra un aumento de la afinidad de unión para el FcRn humano por encima del Fc de IgG humano, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 100 veces, al menos 125 veces, al menos 150 veces. En una realización específica, la afinidad de unión para un FcRn humano aumenta aproximadamente 170 veces.

Para la afinidad de unión a FcRn, en una realización, la CE50 o la Kd aparente (a pH 6,0) del polipéptido es menor de 1 uM, más preferentemente menos de o igual a 100 nM, más preferentemente menos de o igual a 10 nM. En una realización, para la afinidad de unión aumentada a FcγRIII (F158; es decir el isotipo de baja afinidad) la CE50 o Kd aparente es menor o igual a 10 nM, y para FcγRIII (V158; isotipo de alta afinidad) la CE50 o Kd aparente es menor o igual a 3 nM. De acuerdo con otra realización, una reducción de la unión de un anticuerpo a un receptor Fc con respecto al anticuerpo control (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®) se puede considerar significativa con respecto al anticuerpo de control si la relación de los valores de las absorbancias en los puntos medios de las curvas de unión del anticuerpo de ensayo y del anticuerpo de control (por ejemplo, $A_{450 \text{ nm}}(\text{anticuerpo}) / A_{450 \text{ nm}}(\text{Ab control})$) es menor o igual al 40 %. De acuerdo con otra realización, un aumento de la unión de un anticuerpo a un receptor Fc con respecto a un anticuerpo control (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®) se puede considerar significativo con respecto al anticuerpo de control si la relación de 31 de los valores de las absorbancias en los puntos medios de las curvas de unión del anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de control (por ejemplo, $A_{450 \text{ nm}}(\text{anticuerpo}) / A_{450 \text{ nm}}(\text{Ab control})$) es mayor o igual al 125 %. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 16.

Un “polipéptido parental” o “anticuerpo parental” es un polipéptido o anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácido de la que proviene el polipéptido o anticuerpo variante y contra el que se compara el polipéptido o anticuerpo variante. Normalmente el polipéptido parental o el anticuerpo parental carece de una o más de las modificaciones desveladas en el presente documento y se diferencian en la función efectora en comparación con el polipéptido variante, como se desvela en el presente documento. El polipéptido parental puede comprender una secuencia de la región Fc nativa o una región Fc con modificaciones de secuencia de aminoácidos pre-existentes (tales como adiciones, eliminaciones y/o sustituciones).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden derivar de fagos de presentación. Como se utiliza en el presente documento, “biblioteca” se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo, o 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.

“Fagos de presentación” es una técnica por la que los polipéptidos variantes se presentan como proteínas de fusión a al menos una parte de la proteína de revestimiento de la superficie del fago, por ejemplo, filamento del fago, partículas. Una utilidad del fago de presentación reposa en el hecho de que se pueden clasificar grandes bibliotecas de variantes proteicas aleatorias rápida y eficazmente por las secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas sobre el fago se ha utilizado para explorar en

millones de polipéptidos los que tienen propiedades de unión específica. Los métodos de fago de presentación polivalentes se han utilizado para presentar pequeños péptidos aleatorios y pequeñas proteínas por medio de fusiones a o el gen III o el gen VIII del fago filamentoso. Wells y Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362 (1992), y referencias citadas en el presente documento. En un fago de presentación monovalente se fusiona una biblioteca de péptidos o proteínas a un gen III o una parte del mismo, y se expresan a bajos niveles en presencia de la proteína del gen III tipo silvestre de forma que las partículas de fago presentan una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avidez se reducen con respecto al fago polivalente ya que la clasificación se hace basándose en la afinidad de ligandos intrínsecos, y se utilizan vectores fagémidos, que simplifican las modificaciones de ADN. Lowman y Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991).

Un "fagémido" es un vector plásmido que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, ColE1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede utilizar sobre cualquier bacteriófago conocido, incluyendo el bacteriófago filamentoso y el bacteriófago lambda. El plásmido también contendrá generalmente un marcador genético de resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN que se clonan en estos vectores se pueden propagar como plásmidos. Cuando se proporcionan a las células que albergan estos vectores todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación circular rodante para generar copias de una cadena del plásmido y un paquete de partículas de plásmido. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas y no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de cubierta del fago o un fragmento del mismo unido a un gen de polipéptido heterólogo como un gen de fusión tal que el gen de polipéptido heterólogo se presenta en la superficie de la partícula del fago.

La expresión "vector fago" significa una forma de replicación de doble cadena de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y es capaz de replicación. El vector fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación del fago y la formación de partículas de fago. El fago es preferentemente un fago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un fago lambda, tales como lambda, 21, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos.

Las modificaciones covalentes de polipéptidos tales como peptidocruces, inmunoadhesinas, anticuerpo y péptidos cortos están incluidos en el ámbito de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de restos de aminoácidos dirigidos de un polipéptido con un agente derivador orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o restos de los extremos N o C del polipéptido. La derivación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para entrecruzar el polipéptido con una matriz de soporte hidrosoluble o superficie para su uso en el método de purificación de anticuerpos y viceversa. Los agentes que se utilizan comúnmente en el entrecruzamiento incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con el ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen los ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobi(succinimidil-propionato), maleimidas bifuncionales tales como bi-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[p-azidofenil] ditiol propioimidato.

Otras modificaciones incluyen desaminación de restos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetilación de la amina del extremo N, y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

Otras modificaciones incluyen la conjugación de toxinas para los antagonistas tales como maitansina y maitansinoides, calicheamicina y otros agentes citotóxicos.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende la unión del polipéptido a uno de varios polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera que se expone en las Patentes de EE. UU. N^{os} 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

El polipéptido de la presente divulgación también se puede modificar si es ventajoso de manera que forme una molécula quimérica que comprenda el polipéptido fusionado a otro, polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos (por ejemplo, inmunoadhesinas o peptidocruces).

Tal molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con un dominio de transducción de proteínas que dirige el polipéptido para suministrarlo a varios tejidos y más particularmente a través de la barrera hematoencefálica, utilizando, por ejemplo, el dominio de transducción de proteínas del virus de inmunodeficiencia humana proteína TAT (Schwarze et al., 1999, Science 285: 1569-72).

Tal molécula quimérica puede comprender también una fusión del polipéptido con un polipéptido marcado que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marca. El epítipo marcado se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de tales formas de epítipos marcados del polipéptido se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido marcado. También la provisión del epítipo marcado hace posible que el polipéptido se purifique fácilmente por purificación de afinidad utilizando un

anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo marcado. Se conocen varios polipéptidos marcados y sus respectivos anticuerpos en la técnica. Ejemplo incluyen marcas poli-histidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-gly); el polipéptido marcado flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 del mismo [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y marcador glucoproteína D (gD) del virus del Herpes Simple y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcados incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido con epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido con epítipo α -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y el péptido marcado proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

La molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región de inmunoglobulina particular. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (por ejemplo, una "inmunoadhesina"), tal fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig de la presente divulgación incluyen polipéptidos que comprenden aproximadamente o solo los restos 94-243, restos 33-53 o restos 33-52 de seres humanos en lugar de al menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión con inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones con inmunoglobulinas véase también la Patente de EE. UU. 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995.

La invención proporciona medios y composiciones como se definen en las reivindicaciones para inhibir o evitar la recurrencia del crecimiento de un tumor o la recurrencia del crecimiento de células cancerosas. En varias realizaciones, un cáncer tiene una recurrencia del crecimiento del tumor o una recurrencia del crecimiento de células cancerosas cuando 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 falta cualquier reducción del tamaño o del número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas tienen una recurrencia del crecimiento tumoral o recurrencia del crecimiento de células cancerosas se puede realizar o in vivo o in vitro por cualquier método conocido en la técnica por el ensayo de la eficacia del tratamiento sobre las células cancerosas. Un tumor resistente a un tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de recurrencia de un crecimiento tumoral.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición como se desvela en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin establecido específicamente. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y por métodos conocidos en relación a un fin establecido.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido o antagonista de la presente invención eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un mamífero (paciente aka). En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño o peso del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente parar) la infiltración celular cancerosa en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente parar) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Por la extensión a la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático o citotóxico. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que mejora la supervivencia libre de progresión de un paciente.

E el caso de curación de heridas, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para acelerar o mejorar la curación de heridas en un sujeto. Una dosis terapéutica es una dosis que muestra un efecto terapéutico en el paciente y una dosis sub-terapéutica es una dosis que no muestra un efecto terapéutico sobre el paciente tratado.

Una "herida crónica" se refiere a una herida que no se cura. Véase, por ejemplo, Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994). Las heridas crónicas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, úlceras arteriales, úlceras diabéticas, úlceras de presión, úlceras venosas, etc. Una herida aguda se puede desarrollar en herida crónica. Las heridas agudas incluyen, pero no se limitan a, heridas causadas, por ejemplo, por lesiones térmicas, traumatismos, cirugías, escisión de un cáncer de piel extenso, infecciones bacterianas o fúngicas profundas, vasculitis, escleroderma, pénfigo, necrosis epidérmica tóxica, etc. Véase, por ejemplo, Buford, Wound Healing and Pressure Sores, HealingWell.com, publicado el 24 de octubre de 2001. Una "herida normal" se refiere a una herida que se somete a una curación reparadora de heridas normal.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención capaz de inhibir el crecimiento de una células, especialmente tumoral, por ejemplo, una células cancerosa, o in vitro o in vivo. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención con el fin de inhibir el crecimiento de una células neoplásica se puede determinar empíricamente por métodos conocidos o por ejemplos que se proporcionan en el presente documento.

Una "cantidad citotóxica" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención es una cantidad capaz de producir la destrucción de una células, especialmente tumoral, por ejemplo, célula cancerosa, o in vitro o in vivo. Una "cantidad citotóxica" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de la presente invención con el fin de inhibir el crecimiento de una células neoplásica puede determinarse empíricamente y por métodos conocidos en la técnica.

Una "enfermedad autoinmunitaria" en el presente documento es una enfermedad o trastorno que aparece de y se dirige contra los tejidos propios del individuo o un co-segregado o manifestación del mismo o la afección resultante del mismo. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a artritis (artritis reumatoide, tales como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis de la gota, artritis de gota aguda, artritis de gota crónica, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, artritis vertebral, y artritis reumatoide de aparición juvenil, osteoartritis, artritis crónica progresiva, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, y espondilitis anquilosante), enfermedades hiperproliferativas inflamatorias de la piel, psoriasis, tales como psoriasis en placas, psoriasis gutatta, psoriasis pustular, y psoriasis de las uñas, dermatitis incluyendo la dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis herpetiforme, y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM unida a x, urticaria tal como urticaria crónica idiopática, incluyendo la urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrosis epidérmica tóxica, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (MS) tal como MS espino-óptica, MS primaria progresiva, y MS recurrente remitente, esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arterioesclerosis, esclerosis diseminada, y esclerosis atáxica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, y colitis transmural, y enfermedad intestinal inflamatoria), pioderma gangrenosa, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, epiescleritis, síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria de adulto o agudo (ARDS), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, espondilitis reumatoide, pérdida repentina de audición, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tales como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tallo cerebral, uveítis, tales como uveítis posterior, o uveítis autoinmunitaria, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN inmunomediada, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática, GN membranosa proliferativa (MPGN), incluyendo tipo I y tipo II, y GN rápidamente progresiva, afecciones alérgicas, reacción alérgica, eczema incluyendo el eczema alérgico o atópico, asma tal como el asma bronquiolar, asma bronquial y asma autoinmunitario, afecciones que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus eritematoso sistémico (LES) o lupus eritematoide sistémico tal como el LES cutáneo, lupus eritematoso subagudo, síndrome de lupus neonatal (NLE), lupus eritematoso diseminado, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, discoide, alopecia), diabetes mellitus de aparición juvenil (Tipo I), incluyendo la diabetes mellitus insulino dependiente pediátrico (IDDM), diabetes mellitus de aparición en adultos (diabetes tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y demorada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo la granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo la vasculitis (que incluye la vasculitis de grandes vasos (incluyendo la vasculitis de polimialgia reumática y células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medios (que incluye la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, vasculitis del SNC, vasculitis necrotizante, cutánea o de hipersensibilidad, vasculitis necrotizante sistémica, y vasculitis asociada a ANCA, tales como la vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmunitaria, anemia Coombs positiva, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica que incluye la anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), enfermedad de Addison, anemia o aplasia de glóbulos rojos pura (PRCA), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapédesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de fallo multiorgánico tales como el secundario a septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de basamento de membrana anti-glomerular, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet o Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tales como el penfigoide bullosos y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo el pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo penfigoide mucomembranoso, y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad o síndrome de Reiter, complejo nefrítico inmunitario, nefritis mediada por anticuerpo, neuropatía crónica tal como polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como la que se desarrolla en pacientes de infarto de miocardio, por ejemplo), que incluye la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o mediada inmunitariamente tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) incluyendo la ITP aguda o crónica, enfermedad autoinmunitaria de los testículos y ovarios incluyendo la orquitis y ooforitis autoinmunitarias, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis tales como la tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como los síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, que incluyen síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como el síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de hombre rígido o

persona rígida, encefalomiелitis tal como la encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica experimental (EAE),
 miastenia gravis, degeneración cerebelar, neuromiотонía, opsoclono o síndrome opsoclono mioclono (OMS), y
 neuropatía sensorial, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis
 de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, pneumonitis linfoide
 5 intersticial, bronquiolitis obliterante (no de trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger
 (nefropatía de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis de IgA lineal, cirrosis primaria biliar, pneumonocirrosis,
 síndrome de enteropatía autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad celíaca, enfermedad celíaca (enteropatía
 por gluten), enfermedad celíaca refractaria, enfermedad celíaca idiopática, crioglobulinemia, esclerosis amiotrófica
 10 lateral (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno
 (AIED) o pérdida de oído autoinmunitaria, síndrome de opsoclono mioclono (OMS), policondritis tal como la
 policondritis recurrente o refractaria, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, escleritis, una linfocitosis no
 cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye la linfocitosis de células B monoclonal (por ejemplo, gammapatía
 monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), neuropatía periférica,
 15 síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera,
 ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis
 segmentaria focal (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico
 autoinmunitario, fibromialgia, fallo endocrino múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia
 20 presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias, nefropatía
 diabética, síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad
 esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad masculina y femenina autoinmunitaria, enfermedad de tejido
 conjuntivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema
 multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de cuidador de aves, angeítis granulomatosa
 25 alérgica, angeítis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como la alveolitis alérgica y alveolitis
 fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar intersticial, reacción transfusional, lepra, malaria,
 leishmaniosis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de
 Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar
 intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis
 30 fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis
 heterocrómica, iridociclitis, o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schönlein, infección por virus de inmunodeficiencia
 humana (HIV), infección por ecovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección
 por virus de rubeola, síndromes post-vacunación, infección de rubeola congénita, infección por virus de Epstein-Barr,
 paperas, síndrome de Evan, fallo gonadal autoinmunitaria, corea de Sundenham, nefritis post-estreptocócica,
 35 tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsalis, coroiditis, polimialgia de células gigantes, oftalmopatía
 endocrina, pneumonitis de hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica,
 síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión de isquemia-reperusión y familiar benigna,
 autoinmunidad retiniana, inflamación articular, bronquitis, enfermedad obstructiva crónica de vías aéreas, silicosis,
 aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioescleróticos, aspermiogénesis, hemólisis autoinmunitaria, enfermedad de
 40 Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso
 leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich,
 pérdida de audición sensorial, hemoglobiuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia,
 mononucleosis infecciosa, miелitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis
 granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenosa, tiroiditis de Quervan, atrofia esplénica
 45 adquirida, infertilidad debido a anticuerpos anti-espermatozoides, timoma no maligno, vitíligo, enfermedades asociadas
 al virus de Epstein-Barr y SCID, síndrome de deficiencia inmunitaria adquirida (SIDA), enfermedades parasitarias
 tales como Leishmania, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican la infiltración
 de células T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda o
 demorada mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que implican la diapedesis de leucocitos, síndrome
 50 de fallo multiorgánico, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad del basamento de
 membrana antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ooforitis, mixedema primario,
 gastritis atrófica autoinmunitaria, oftalmia simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad de tejido conjuntivo
 mixto, síndrome nefrítico, insulinitis, fallo poliendocrino, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmune tipo
 I, hipoparatiroidismo idiopático de aparición en adulto (AOIH), alopecia total, cardiomiopatía dilatada, epidermolisis
 55 bullosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrítico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis
 purulenta y no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoides, frontal, maxilar o esfenoides, un trastorno
 relacionado con los eosinófilos tales como eosinofilia, infiltración eosinofílica pulmonar, síndrome mialgia-eosinofilia,
 síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis broncopneumónica,
 Aspergiloma, o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxia, espondiloartritis seronegativas, enfermedad
 poliendoctrina autoinmunitaria, colangitis esclerosante, candidiasis de la esclerótica, epiesclerótica, mucocutánea
 60 crónica, síndrome de Bruton, hipogamaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia
 telangiectasia, trastornos autoinmunitarios asociados con enfermedad de colágeno, reumatismo, enfermedad
 neurológica, trastorno de reperusión isquémica, respuesta a la reducción de la presión sanguínea, disfunción
 vascular, angiectasia, lesiones tisulares, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta
 aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, síndrome asociados a transfusión de
 65 granulocitos, toxicidad inducida por citoquinas, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielitis,
 pneumocirrosis, retinopatía diabética, trastorno arterial grande diabético, hiperplasia endarterial, úlcera péptica,
 valvulitis, y endometriosis.

Los tratamientos contra el cáncer se pueden evaluar, por ejemplo, por, pero sin limitarse a, regresión tumoral, disminución del peso o tamaño tumoral, tiempo de progresión, duración o supervivencia, supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta completa, duración de respuesta, calidad de vida, expresión de proteínas y/o actividad. Debido a los agentes anti-angiogénicos descritos en el presente documento que se dirigen a la vascularización del tumor y no necesariamente a las células neoplásicas mismas, representan una clase única de fármacos anticáncer, y por lo tanto pueden necesitar mediciones y definiciones únicas de respuestas clínicas a los fármacos. Por ejemplo la disminución del tumor de más del 50 % en un análisis de 2 dimensiones es el punto de corte de referencia que declara una respuesta, Sin embargo, los antagonistas de alfa5beta1 y los antagonistas de VEGF de la invención pueden producir la inhibición de la diseminación metastática sin reducción del tumor primario, o pueden ejercer simplemente un efecto tumoriestático. En consecuencia, las estrategias para determinar la eficacia de la terapia que se puede emplear, que incluye por ejemplo, la medición de marcadores plasmáticos o urinarios de angiogénesis y la medición de la respuesta por medio de imágenes radiológicas.

Dependiendo de la indicación que se va a tratar y los factores relevantes para la dosificación con los que un médico experto en el campo estaría familiarizado, los anticuerpos de la invención se administrarán a una dosificación que sea eficaz para el tratamiento de la indicación mientras que se minimicen la toxicidad y los efectos secundarios. Para el tratamiento de un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad con inmunodeficiencia, la dosificación terapéuticamente eficaz puede estar, por ejemplo, en un intervalo de 50 mg/dosis a 2,5 g/m². En una realización, la dosificación que se administra es aproximadamente de 250 mg/m² a aproximadamente 400 mg/m² o 500 mg/m². En otra realización, la dosificación es aproximadamente de 250-375 mg/m². En otra realización más el intervalo de dosificación es de 275-375 mg/m².

Los tratamientos para la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) se pueden evaluar por, pero sin limitarse a, la reducción de la tasa de o la prevención de mayor pérdida de visión. Para la terapia de AMD, la eficacia in vivo se puede, por ejemplo, medir por uno o más de los siguiente: evaluación del cambio medio en la agudeza visual mejor corregida (BCVA) a partir de una línea base en un tiempo deseado, evaluación de la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras de agudeza visual en un tiempo deseado en comparación con la línea base, evaluación de la proporción de sujetos que ganan más de o igual a 15 letras en la agudeza visual en un tiempo deseado en comparación con la línea base, evaluación de la proporción de sujetos con una agudeza visual de Snellen equivalente a 20/2000 o peor a un tiempo deseado, como se avalúa por angiografía fluorescente, etc.

El término “detectar” se pretende que incluye la determinación de la presencia o ausencia de una sustancia o la cuantificación de la cantidad de una sustancia. El término se refiere por lo tanto al uso de materiales, composiciones, y métodos de la presente invención para las determinaciones cualitativas y cuantitativas. En general, la técnica particular que se utiliza para la detección no es crítica para la práctica de la invención.

Por ejemplo, “detectar” de acuerdo con la invención puede incluir: observar la presencia o ausencia del producto del gen alfa5, moléculas de ARNm, o un polipéptido alfa5; un cambio en los niveles de un polipéptido alfa5 o la cantidad unida a una diana; un cambio en la función/actividad biológica de un polipéptido alfa5. En algunas realizaciones, “detectar” puede incluir detectar los niveles de alfa5 tipo silvestre (por ejemplo niveles de ARNm o polipéptido). Detectar puede incluir cuantificar un cambio (aumento o descenso) de cualquier valor entre un 10 % y un 90 %, o de cualquier valor entre un 30 % y un 60 %, o más del 100 %, cuando se comparan con un control. Detectar puede incluir cuantificar un cambio de cualquier valor entre 2 veces a 10 veces, inclusive, o más, por ejemplo, 100 veces.

La palabra “marcador” cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente con el anticuerpo. El marcador puede detectarse por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Nuevos anticuerpos anti-alfa5beta1

Los nuevos anticuerpos que se pueden unir al alfa5beta1 humano se desvelan en el presente documento. De acuerdo con una realización el anticuerpo anti-alfa5beta1 se produce por un hibridoma que se selecciona de entre el grupo que consiste en el hibridoma depositado como Alfa5/beta1 7H5 4.2.8 (ATCC N° PTA-7421) y el hibridoma depositado como Alfa5/beta1 7H12.5.1.4 (ATCC N° PTA-7420) en la ATCC el 7 de marzo de 2006. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo se produce por un hibridoma que se selecciona de entre el grupo que consiste en el hibridoma depositado como Alfa5/beta1 7H5 4.2.8 (ATCC N° PTA-7421) y el hibridoma depositado como Alfa5/beta1 7H12.5.1.4 (ATCC N° PTA-7420) en la ATCC el 7 de marzo de 2006. De acuerdo con otra realización más, el anticuerpo comprende la secuencia del dominio variable pesado (VH) y variable ligero (VL) del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como Alfa5/7H5 4.2.8 (ATCC N° PTA-7421) en la ATCC el 7 de marzo de 2006. En otra realización, el anticuerpo comprende la secuencia del dominio variable pesado (VH) y variable ligero (VL) del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como Alfa5/beta1 7H12.5.1.4 (ATCC N° PTA-7420) en la ATCC el 7 de marzo de 2006. Se contemplan también las formas humana o quimérica de los anticuerpos de los hibridomas depositados.

De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une a un alfa5betal humano con una Kd entre 500 nM y 1 pM. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo no se une al alfaVbeta3 o alfaVbeta5 o alfaVbeta1. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo comprende una secuencia Fc de una IgG humana, por ejemplo, IgG1 humana o IgG4 humana. En otra realización, se ha alterado o, de otra manera, se ha cambiado una secuencia Fc de forma que carece de función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a menudo relacionada a su unión con receptores Fc (FcR). Hay muchos ejemplos de cambios o mutaciones de secuencias Fc que pueden alterar la función efectora. Por ejemplo, el documento WO00/42072 (Presta) y Shields et al, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) describen anticuerpos variantes que mejoran o disminuyen la unión a FcR. El anticuerpo puede estar en forma de un fragmento Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv; un diacuerpo y un anticuerpo lineal. También el anticuerpo puede ser un anticuerpo multi-específico que se une al alfa5beta1 y es un antagonista alfa5beta1, pero también se une a una o más de otras dianas e inhibe su función (por ejemplo, VEGF). El anticuerpo se puede conjugar con un agente terapéutico (por ejemplo un agente citotóxico, un radioisótopo y un agente quimioterápico) o un marcador para detectar alfa5betal en muestras de un paciente o in vivo por imágenes (por ejemplo, radioisótopos, colorante fluorescente y enzimas).

También se contemplan las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-alfa5betal, los vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o ambos dominios variables, y las células que comprenden las moléculas de ácido nucleico. Estos anticuerpos se pueden utilizar en las terapias descritas en el presente documento y para detectar la proteína alfa5beta1 en muestras de pacientes (por ejemplo, FACS, inmunohistoquímica (IHC), ensayos ELISA) o en pacientes.

Nuevas combinaciones

Se proporcionan en la presente invención nuevas combinaciones para inhibir la angiogénesis y/o la permeabilidad vascular en un sujeto que padece una enfermedad, combinaciones que comprenden un antagonista VEGF y un antagonista alfa5betal, como se define en las reivindicaciones. El antagonista VEGF y el antagonista alfa5beta1 se administran en ciclos de tratamiento concurrentes. Tales tratamientos de combinación son útiles para tratar enfermedades que tienen angiogénesis excesiva y que se beneficiarían de una terapia anti-angiogénica. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedad ocular y enfermedad autoinmunitaria. Algunos pacientes que experimentan niveles elevados de alfa5beta1 naturalmente o en respuesta a una terapia antagonista de VEGF, en comparación con pacientes no enfermos o de control, pueden responder especialmente a este tratamiento de combinación. Las combinaciones comprenden además un agente terapéutico (por ejemplo, un agente anti-neoplásico, un quimioterápico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico) están contempladas. Por ejemplo, los pacientes que se van a tratar con quimioterapia (por ejemplo, irinotecan) y antagonistas alfa5beta1, o lo que se han tratado con quimioterapia y antagonistas alfa5beta1, se pueden beneficiar de la terapia con antagonista de VEGF. De manera alternativa los pacientes que se han tratado con quimioterapia y antagonistas VEGF se pueden beneficiar de la terapia con antagonista alfa5beta1. En una realización preferida, el anticuerpo anti-VEGF es el anticuerpo Avastin®. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-alfa5betal es un anticuerpo anti-alfa5beta1 descrito en el presente documento. Se contemplan kits que comprenden un antagonista VEGF, un antagonista alfa5betal y, opcionalmente, un agente quimioterápico.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos que se utilizan de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos 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 seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones que forman sales tales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de anticuerpo ejemplares se describen en el documento WO98/56418. Formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración se describen en el documento WO97/04801. Tales formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado para una concentración alta en proteínas y la formulación reconstituida se puede administrar por vía subcutánea al mamífero que se va a tratar en el presente documento.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo si es necesario para la indicación particular que se va a tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no afectan de manera adversa unos a otros. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente citotóxico,

agente quimioterápico, citoquina o agente inmunosupresor (por ejemplo el que actúa sobre las células T, tales como ciclosporina o un anticuerpo que se une a células T, por ejemplo el que se une a LFA-1). La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores expuestos anteriormente. Se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y vías de administración que se describen en el presente documento o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas con anterioridad.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen las matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o alcohol polivinílico, poliláctidos (Pat. de EE. UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable tales como LUPRON DEPOT™ (microsferas inyectables compuestas de copolímero de ácido glicólico ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3- hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Artículos de Fabricación y Kits

Otra realización de la invención como se define en las reivindicaciones es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de tumores, enfermedad ocular o enfermedades autoinmunitarias y afecciones relacionadas. El artículo de fabricación puede comprender un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los envases pueden formarse de varios materiales tales como cristal o plástico. En general, el envase mantiene una composición que es eficaz para el tratamiento de 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). La composición comprende un antagonista de VEGF y un antagonista de alfa5beta1. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección particular. La etiqueta o prospecto comprenderá además instrucciones para la administración de la composición del anticuerpo al paciente. También se proporcionan kits como se definen en las reivindicaciones comprenden terapias de combinación que se describen en el presente documento.

El prospecto se refiere a instrucciones a medida incluidas en los envases de productos terapéuticos, que contiene información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias que conciernen al uso de tales productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento de linfoma no Hodgkin.

Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tampón de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Se pueden incluir otros materiales deseables a partir del punto de vista comercial y el usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se desvelan también kits que son útiles para varios fines, por ejemplo, para el aislamiento o detección de alfa5beta1 y/o VEGF en pacientes, opcionalmente en combinación con los artículos de fabricación. Para el aislamiento y purificación de alfa5beta1, el kit puede contener un anticuerpo anti-alfa5beta1 acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de sepharosa). Se pueden proporcionar kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de alfa5beta1 y/o VEGF in vitro, por ejemplo en un ELISA o una transferencia de Western. Como el artículo de fabricación, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Por ejemplo, el envase mantiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-alfa5beta1 de la invención. Se pueden incluir envases adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso diagnóstico in vitro que se pretende.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, utilizando los métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975) o se pueden producir por métodos de ADN recombinante

(Patente de EE. UU. Nº 4.816.567) o se pueden producir por los métodos descritos en el presente documento en la sección de Ejemplos. En un método de hibridoma, normalmente se inmuniza un ratón, hámster, u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. De manera alternativa, los linfocitos pueden

inmunizarse in vitro.

El agente inmunizante incluirá normalmente un polipéptido o una proteína de fusión de la proteína de interés o una composición que comprende la proteína. Generalmente, se utilizan o linfocitos de células de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se utilizan esplenocitos o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero modificadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino, y humano. Habitualmente, se emplean las líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio "HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan un alto nivel estable de expresión de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y el heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede ensayar en cuanto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales que se producen por las células de hibridoma se puede determinar por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede, por ejemplo, determinar por el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y el crecimiento por métodos de referencia. Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. De manera alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden también producirse por métodos de ADN recombinante, tales como los que se describen en la Patente de EE. UU. Nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden aislar fácilmente y secuenciarse de utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan entonces en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera inmunoglobulina proteica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinante. El ADN se puede modificar también, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de EE. UU. Nº 4.816.567; Morrison et al., *supra*) o por unión covalente con toda la secuencia codificante de inmunoglobulina o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. Tal polipéptido no inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc de forma que evita el entrecruzamiento de la cadena pesada. De manera alternativa, los restos de cisteína relevante se sustituyen con otro resto de aminoácido o se eliminan de forma que se evita el entrecruzamiento.

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede conseguir utilizando, pero sin limitarse a, las técnicas conocidas en la técnica.

5 Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que normalmente contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los restos de una CDR del receptor se rempazan por restos de una CDR de especies no humanas (anticuerpo donante) tales como de ratón, rata, o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de estructura Fv de la inmunoglobulina humana se reemplaza por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden también comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de estructura. En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todas de al menos una, y normalmente dos, dominios variables, en las que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferentemente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Algunos métodos para humanizar anticuerpos no humanos se describen en la técnica y posteriormente en los Ejemplos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". De acuerdo con una realización, la humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colegas (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos (Patente de EE. UU. N° 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos CDR y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible actualmente producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces al inmunizarlos, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal daba como resultado la inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz genética de inmunoglobulina de línea germinal humana en tal ratón mutante de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos al desafiarse con el antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); Patentes de EE. UU. N°s 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todos de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852. De manera alternativa, los anticuerpos humanos se pueden producir introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Al desafiarse, se observa la producción de anticuerpos humanos que se parecen estrechamente a los que se ven en seres humanos respecto a todo, incluyendo el reordenamiento genético, ensamblaje, y repertorio. Esta estrategia se describe por ejemplo en las Patentes de EE. UU. N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016, y las siguientes publicaciones científicas: 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 Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

De manera alternativa, se puede utilizar la tecnología de fago de presentación (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de los repertorios del gen variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con una realización de esta técnica, las secuencias del dominio V del anticuerpo se clonan en fase en o un gen mayor o un gen menor de la proteína de envoltura de un bacteriófago filamentoso, tal como M 13 o Fd, y presentando como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. El fago de presentación se puede llevar a cabo en varios formatos, por ejemplo, como se describe en la sección de Ejemplos posteriormente o como se revisa, por ejemplo, en Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos genéticos V para el fago de presentación. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) asilaba una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca pequeña de combinación

aleatoria derivada de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar una matriz diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Véase también, Patentes de EE. UU. N^{os} 5.565.332 y 5.573.905.

Como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos humanos también se pueden generar por células B activadas in vitro (véase las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos humanos se pueden producir también utilizando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de fago de presentación. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991).

Anticuerpos multi-específicos

Los anticuerpos multi-específicos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para dos o más antígenos diferentes (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos). Por ejemplo, una de las especificidades de unión puede ser por el anticuerpo alfa5betal, el otro puede ser por cualquier otro antígeno. De acuerdo con una realización preferida, el otro antígeno es una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor. Por ejemplo, la proteína de superficie celular puede ser un receptor de célula citolítica natural (NK). Por lo tanto, de acuerdo con una realización, un anticuerpo biespecífico de la presente invención puede unirse a alfa5betal y unirse a VEGF.

Ejemplos de los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se han descrito. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadenas pesadas/cadenas ligeras de inmunoglobulina en que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades. Milstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983). Debido a la distribución aleatoria de cadenas pesadas y ligeras, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se consigue por cromatografía de afinidad en etapas. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Los dominios de anticuerpo variables con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la región de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la región del primer dominio constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión con la cadena ligera 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 por separado, se insertan en diferentes vectores de expresión, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles de cómo generar anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

También se han descritos varias técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina a partir de proteínas Fos y Jun se ligaron a porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes pro fusión genética. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se re-oxidan para formar heterodímeros de anticuerpo. Este método se puede utilizar también para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de diacuerpo descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden una VH conectada a una VL por un enlazador 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 fuerzan a emparejarse con la complementariedad de dominios VL y VH de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión al antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpo biespecíficos por el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para células de un sistema inmunitario dirigido contra células no deseadas (Patente de EE. UU. N^o 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH. Documentos WO 91/00360; WO 92/200373;

EP 03089. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar in vitro utilizando métodos conocidos en síntesis proteica química, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuros o formando un enlace tioéter. Ejemplos de agentes adecuados para este fin incluye iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los desvelados, por ejemplo en la Patente de EE. UU. N° 4.676.980.

Modificación por ingeniería genética de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a su función efectora, de forma que aumente, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se pueden introducir resto(s) de cisteína en la región Fc, para permitir de esta manera la formación de puentes disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera tienen una capacidad de internalización mejorada y/o el aumento de destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase, Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con aumento de la actividad antitumoral se pueden preparar también utilizando entre-enlazadores heterobifuncionales como se describen en Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). De manera alternativa, se puede modificar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y de esta manera se puede aumentar las capacidades de lisis por complemento y ADCC. Véase, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

Se pueden hacer mutaciones o alteraciones para mejorar la unión al FcR (por ejemplo FcγR, FcRn). De acuerdo con una realización, un anticuerpo de la presente invención tiene al menos una función efectora alterada que se selecciona de entre el grupo que consiste en ADCC, CDC, y unión a FcRn mejorada en comparación con una IgG nativa o un anticuerpo parental. Ejemplos de varias mutaciones específicas útiles se describen por ejemplo, en Shields, RL et al. (2001) JBC 276(6):6591-6604; Presta, L.G., (2002) Biochemical Society Transactions 30(4):487-490; y la publicación WO WO00/42072.

De acuerdo con una realización, la mutación del receptor Fc es una sustitución en al menos una posición que se selecciona de entre el grupo que consiste en: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en que la numeración de los restos en la región es según el sistema de numeración EU.

Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterápico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterápicos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena de la difteria A, fragmentos no de unión activos de la toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleuritis fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de charantia momordica, curcina, crocina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Hay disponibles varios radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹²³In, ⁹⁰Y, y ¹⁸⁶Re.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se producen utilizando varios agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como suberato de disuccinidomilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuesto fluorados activos bis (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina ricina se puede preparar como describe Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido carbono-14-marcado 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026.

En otra realización. El anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como la estreptavidina) para la utilización en un tumor predirigido en que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, para después retirar el conjugado no unido e la circulación utilizando un agente aclarante y luego se administra un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Inmunoliposomas

Los anticuerpos desvelados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como el descrito por Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y Patente de EE. U.U. N^{os} 4.485.045 y 4.544.545. los liposomas con tiempo de circulación aumentado se desvelan en la Patente de EE. UU. N^o 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se puede conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio disulfuro. Un agente quimioterápico (tal como la Doxorubicina) está contenida opcionalmente en el liposoma. Véase, Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

Composiciones farmacéuticas de anticuerpos y polipéptidos

Los anticuerpos se unen específicamente a un polipéptido que se identifica en el presente documento, así como con otras moléculas identificadas por los ensayos de selección desvelados anteriormente en el presente documento, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos como se ha señalado anteriormente y posteriormente en forma de composiciones farmacéuticas.

Las lipofectinas o liposomas se pueden utilizar para suministrar los polipéptidos y anticuerpos o composiciones de la presente invención en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, las moléculas peptídicas se pueden diseñar para que retengan la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Tales péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o se pueden producir por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

La formulación en el presente documento puede contener también más de un principio activo si es necesario para una particular indicación que se va a tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarios y no se afectan adversamente uno a otro. De manera alternativa, o además, la composición puede comprender un agente que aumenta su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, agente quimioterápico, o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación con cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, las microcápsulas de gelatina y las microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.

Las formulaciones para su uso in vivo tienen que ser estériles. Estos se consiguen fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o alcohol polivinílico, poliláctidos (Pat. de EE. UU. N^o 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT® (microsferas inyectables compuestas por copolímero ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida) y poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico hace posible la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante cortos espacios de tiempo. Cuando los antibióticos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado la pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden concebir 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 por medio de intercambio tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando los restos sulfhidrido, liofilizando a partir de soluciones ácidas, control del contenido en humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímero específico.

Usos diagnósticos y obtención de imágenes

Los anticuerpos marcados, y derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido se pueden utilizar con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar, o controlar enfermedades y/o trastornos asociados con la expresión, expresión aberrante y/o actividad de un polipéptido de la invención. De acuerdo con una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en ensayos diagnósticos o ensayo por imagen que implica la inyección del anticuerpo en un sujeto. La invención se proporciona para la detección de expresión aberrante de un VEGF o polipéptido alfa5beta1, que comprende (a) ensayar la expresión del polipéptido en las células (por ejemplo, un tejido) o fluidos corporales de un individuo utilizando uno o más anticuerpos de la presente invención y (b) comparar el nivel de la expresión genética con un nivel de expresión genética de referencia, por lo que un aumento o descenso del nivel de expresión genética ensayada en comparación con el nivel de expresión de referencia es indicativo de expresión aberrante.

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para ensayar niveles de proteínas en una muestra biológica utilizando métodos histológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión genética de una proteína incluye los inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores adecuados para el anticuerpo de ensayo, se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos tales como yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru ; luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Las técnicas conocidas en la técnica pueden aplicarse a anticuerpos marcados de la invención. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, el uso de agentes de conjugación bifuncionales (véase, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N^{os} 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003).

El diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o la expresión aberrante de VEGF y/o alfa5beta1 en un animal, preferentemente un mamífero y más preferentemente un ser humano que comprende la etapa de detección de las moléculas de alfa5beta1 y/o VEGF en el mamífero. En una realización, después de la administración de un antagonista de VEGF, el diagnóstico comprende: (a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea, o intraperitoneal) a un mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-alfa5beta1 marcado (b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en los sitios del sujeto en que se expresa la molécula de alfa5beta1 (y para que la molécula marcada no unida se aclare a un nivel de fondo); (c) determinar el nivel de fondo; y (d) detectar la molécula marcada en el sujeto, tal que la detección de molécula marcada por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad particular o trastorno asociado con la expresión o la expresión aberrante de alfa5beta1. El nivel de fondo se puede determinar por varios métodos que incluyen, la comparación de un la cantidad de una molécula marcada detectada con respecto a un valor de referencia determinado previamente por un sistema particular.

De acuerdo con una realización específica, la expresión o sobre-expresión del polipéptido alfa5beta1 se determina en un ensayo diagnóstico o pronóstico tras la administración de un agente terapéutico antagonista de VEGF evaluando los niveles de alfa5beta1 presentes en la superficie de una célula (por ejemplo, por medio de un ensayo inmunohistoquímico utilizando anticuerpos anti-alfa5beta1). De manera alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido alfa5beta1 o el ARNm en la células, por ejemplo, por medio de técnicas de hibridación fluorescente in situ utilizando una sonda basada en ácido nucleico que corresponde al ácido nucleico que codifica alfa5beta1 o el complemento del mismo; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de Southern, transferencia de Northern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Se puede estudiar la sobre-expresión de alfa5beta1 midiendo la separación del antígeno en un fluido biológico tal como el suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase también, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N^o 4.933.294 presentada el 12 de junio de 1990, el documento WO 91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la Patente de EE. UU. N^o 5.401.638 presentada el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Junto con los ensayos anteriores, hay disponibles varios ensayos in vivo para los facultativos expertos. Por ejemplo, se pueden exponer células del cuerpo del animal a un anticuerpo que opcionalmente está marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células del mamífero, por ejemplo por barrido externo en busca de radioactividad o analizando un biopsia tomada de un mamífero previamente expuestas al anticuerpo.

Las siguientes secuencias de ADN se depositaron bajo los términos del tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE. UU. A como se describe posteriormente:

Material	Nº de depósito	Fecha de depósito
Alpha5/beta1 7H5.4.2.8	PTA-7421	7 de marzo, 2006
Alpha5/beta1 7H12.5.1.4	PTA-7420	7 de marzo, 2006

Los depósitos del presente documento se hicieron bajo las provisiones del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Fin de Procedimientos de Patentes y las Regulaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable de los depósitos durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los depósitos están disponibles en la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometidos a un acuerdo entre Genentech Inc. y la ATCC, que asegura al disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo de los depósitos al público tras la emisión de la pertinente patente de EE. UU. o tras la apertura al público de cualquier solicitud de patente de EE. UU. o extranjera, cualquiera que sea primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a quien determina la Comisión de Patentes y Marcas de EE. UU. para titularse la misma de acuerdo con la 35 U.S.C 122 y las reglas de la Comisión que persiguen al mismo (incluyendo 37 C.F.R. 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El representante de la presente solicitud está de acuerdo en que si un cultivo de los materiales depositados debiera morir o se perdiera o destruyera cuando se cultivaba bajo condiciones adecuadas, los materiales se remplazarán sin demora a la notificación con otro igual. La disponibilidad del material depositado no se concibe como una licencia para la práctica de la invención en contravención de los derechos garantizados bajo las autoridades de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los Ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique otra cosa. La fuente de las células identificadas en los siguientes Ejemplos, y a lo largo de la especificación, con los números de registro ATCC es la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. A menos de que se señale otra cosa, la presente invención utiliza procedimientos de referencia de tecnología de ADN recombinante, tales como los que se han descrito anteriormente en el presente documento y en los siguientes libros de texto: Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, 1991.

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se debe entender que implica la inclusión de un número entero establecido o un grupo de números enteros pero no la exclusión de otro número entero o grupo de números enteros.

La descripción escrita anterior se considera suficiente para capacitar a un experto en la técnica para la práctica de la invención. Los siguientes Ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención de manera alguna. Además, serán aparentes varias modificaciones además de las mostradas y descritas en el presente documento a partir de la descripción anterior y pueden estar en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Reclutamiento de células del estroma que expresan alfa5beta1 tras la terapia anti-VEGF

Se tiñeron secciones de xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano HT-29 que se había tratado con monoterapia de anticuerpo anti-VEGF B20-4.1 en ratones atímicos para la expresión de anti-alfa5beta1. En comparación con un grupo de control tratado con un anticuerpo de control (anticuerpo anti-ambrosía) en este estudio, la monoterapia B20-4.1 daba lugar a un tiempo medio hasta el punto final (TTE) que correspondía con poca o ninguna actividad. Los tumores se habían medido dos veces a la semana en la duración de 58 días. Los animales se sometieron a eutanasia cuando los tumores alcanzaban el volumen de punto final de 1000 mm³ o en el día 58, lo que sucediera antes, y se calculó el TTE de cada ratón. El resultado del tratamiento se había determinado a partir del porcentaje de "demora del crecimiento" (%TGD), que se define como el porcentaje de aumento en el TTE medio de ratones tratados contra los controles, con diferencias que se consideraban significativas a $0,01 \leq P \leq 0,05$, y altamente significativas a $P < 0,01$ utilizando el análisis de rango Logrank. El valor medio de TTE del grupo de control era de 20,6 días. El tratamiento con monoterapia B20-4.1 daba lugar a TTE medio de 20,1 días que corresponde a sin actividad.

La Figura 1 muestra las secciones de tumor teñidas con anticuerpo anti-alfa5beta1. Se observó un aumento de reclutamiento de células del estroma tras el tratamiento anti-VEGF. Estas células del estroma eran positivas a integrina $\alpha 5\beta 1$ (tinción verde claro).

Ejemplo 2 - Anticuerpos anti-alfa5beta1

Se inyectaron los ratones con alfa5beta1 humana purificada (Chemicon CC1027). Se asilaron las células que expresan anticuerpos anti-alfa5beta1 y se transformaron en líneas celulares de hibridoma. Se depositaron dos líneas celulares de hibridoma denominadas 7H5.4.2.8 y 7H 12.5.1.4 en la ATCC. Véase anteriormente. El anticuerpo producido por el hibridoma 7H5.4.2.8 es un anticuerpo mlgG2a Kappa (también denominado "anticuerpo 7H5" en el presente documento). El anticuerpo producido por el hibridoma 7H 12.5.1.4 es un anticuerpo mlgG2b Kappa (también denominado "anticuerpo 7H 12" en el presente documento).

Ejemplo 3 - Ensayo de unión directa HUVEC

Se lavaron dos veces los cultivos tisulares que contenían células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en crecimiento con PBS. Las células se despegaron del matraz de cultivo con 3-4 ml de una solución de 5 mM de EDTA/PBS. Se añadió medio de cultivo recién preparado a las células y se mezcló. Se recontó una alícuota de las células de la mezcla. Las células se centrifugaron y se lavaron con tampón de lavado (50 mM Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,5) una vez. La concentración celular se ajustó de forma que las células se pudieran sembrar a 25 ul por pocillo en placas MSD de alta unión de 96 pocillos a 25.000 células /pocillo o a 4.000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos (Nº cat.L11XB-1 o nº L11XB-2, respectivamente, Meso Scale Diagnostics, LLC). Las células se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en la placa para permitir la captura. Para bloquear los pocillos, se añadieron a los pocillos 25 ul de tampón de reserva (30 % de suero fetal bovino (FBS) en TBS (50 mM) Tris, 150 mM de NaCl) + 1 mM de CaCl₂/1 mM de MgCl₂, pH 7,5) a los pocillos y se incubó a temperatura ambiente de 30 minutos a una hora.

Se diluyeron seriadamente anticuerpos anti-alfa5beta1 con tampón de ensayo (TBS con 1 mM de CaCl₂/ 1 mM de MgCl₂, pH 7,2 + 2-4 % de FBS) para tener varias concentraciones de anticuerpo. Se lavaron dos veces los pocillos con tampón de lavado y luego se secaron. Se añadieron 25 ul de la dilución de anticuerpo a un pocillo y entonces se incubaron en hielo durante una hora. Los pocillos se lavaron tres veces con TBS.

Se añadieron 25 ul de una solución marcadora sulfo-xmuFc a 0,5 ug/ml a cada pocillo y se incubó en hielo durante 45 minutos a una hora. El marcador sulfo-xmuFc es una IgG anti-murina de cabra: R23-AC-5, marcador MSD-SA: R32-21-AD-5, en hielo durante 45 min a 1 h. Los pocillos se lavaron tres veces con TBS. Se añadieron 150 ul de 2x de tampón de lectura a cada pocillo (4x de tampón de lectura MSD, diluido hasta 2x con dH₂O, nº cat. R92TD-1 (libre de tensioactivo). Se midió la señal electroquimioluminiscente (ECL) consecuente por fotodiodos y se cuantifica como un unidad de luz relativa utilizando un lector MSD (protocolo 6000 por defecto). La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de unión directa HUVEC. La CE50 del anticuerpo 7H5 era 0,22 nM. La CE50 del anticuerpo 7H12 era 0,38 nM.

Ejemplo 4 - Ensayo FACS de anticuerpo anti-alfa5beta1

Se incubaron los anticuerpos 7H12 o 7H5 con células RAJI (una línea celular que no expresa ARNm alfa5beta1 o células HUVEC (una línea celular que expresa altos niveles de ARNm alfa5beta1) en 100 ul. Las células unidas se detectaron utilizando un segundo anticuerpo conjugado fluorescentemente. La Figura 3 muestra por medio del análisis FACS que 7H12 y 7H5 se unen a las células HUVEC y no a las células RAJI. Utilizando las mismas técnicas con sinoviocitos de conejo (HIG-82) o células de mono Rhesus (fibroblastos CL-160 de macaca mulatta o células endoteliales de retina CRL-1780), los inventores observaron que 7H12 y 7H5 se unen a células de conejo y de mono.

Ejemplo 5 - Adhesión celular a la Fibronectina en presencia de anticuerpos anti-alfa5beta1

Se diluyó la fibronectina (Sigma F1141 (bovina) o Roche (1080938 (humana)) a 1 ug/ml en un tampón de carbonato sódico. Se añadieron 100 µl de la solución de fibronectina por pocillo de una placa de 96 pocillos MUNC MaxiSorp y se dejó unirse una noche a 4 °C (Inmunoplasmas NUNC maxisorp de 96 pocillos de fondo plano, MaxiSorp N/Ster 439454 (VWR 62409-002)). Se lavaron entonces los pocillos con solución tamponada de fosfato (PBS) y se bloquearon con un 1 % de BSA (Sigma A9418) durante al menos 30 min. Las placas se lavaron entonces tres veces con PBS. Se añadieron 20.000 células HUVEC en cada pocillo y se incubaron con varias concentraciones de 7H5 o 7H12 en medio de cultivo que contenía 1,4 mM de MgCl₂ y 1,4 mM de CaCl₂. La mezcla de incubación se añadió entonces a la placa revestida de fibronectina. Se añadieron aproximadamente 20.000 células en el mismo medio de cultivo a cada pocillo de control donde no se añadió anticuerpo inhibidor.

Las placas se centrifugaron 5 min a 140 g para sincronizar el contacto de las células con el sustrato. Las células se incubaron en una incubadora con CO₂ durante varios tiempos (de 0 a 120 min). La duración de tiempo de incubación variaba para cada línea celular. Las placas se lavaron entonces tres veces en PBS. Todos los líquidos se retiraron de los pocillos y se congeló a -80 °C. Las placas se descongelaron entonces a temperatura ambiente. Se añadió tampón CyQuant (Sondas moleculares CyQuant C7026) a los pocillos y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 min. Se midió la lectura de DO. La Figura 4 muestra que la CI50 del anticuerpo 7H5 era 0,85 ug/ml (3,44 nM) y la CI50 del anticuerpo 7H12 era 0,7 ug/ml (4,38 nM).

Ejemplo 6 - Ensayo de Proliferación utilizando células HUVEC

Se revistieron placas de 96 pocillos con fibronectina (1 µg/ml) durante una noche. Las placas se lavaron entonces con PBS. Se añadieron 3000-5000 células endoteliales (EC) por 96 pocillos y se les permitió unirse a los pocillos completamente. Se añadieron anticuerpos anti-alfa5 (incluyendo los controles de isotipos). Se utilizaron e pocillos para cada condición. Las células se incubaron entonces con los anticuerpos durante 1-24 horas. Los anticuerpos anti integrina alfa5betal se ensayaron a varias concentraciones (por ejemplo, 0 µg/ml, 4 µg/ml, 16 µg/ml, 60 µg/ml, 120 µg/ml).

Se marcaron entonces las células con BrdU incubándolas con 2 µl de solución de reserva BrdU (25 mg/ml en PBS) en 1 ml de medio de cultivo tisular (EGM2 + todos los suplementos de Clonetics (nº cat. CC-4176). Tras esta incubación se fijaron las células con un 4 % de PFA, tratadas con 1 N de HCl durante 20 min, se lavaron varias veces en PBS, y luego se bloquearon con un 10 % de suero de cabra (PBS con 0,2 % Triton) durante 1-2 horas. Las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal contra BrdU (BD nº cat. 347580 1:40) PBS con un 0,2 % Triton y un 5 % de suero de cabra) y se incubó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa-594 (1:800) durante 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Los pocillos se lavaron de nuevo y se incubaron con DAPI (1:10.000 en PBS) durante 10 min. Tras un lavado final con PBS, el número total de células por pocillo se contó tomando una foto de la tinción DAPI a 5x. Las células que eran positivas a BrdU en el campo. Los resultados se analizaron entonces utilizando Excel. La Figura 5a muestra el recuento total de células HUVEC a las 32 horas después de un número celular de inicio de 5000. La Figura 5b muestra el recuento celular total de HUVEC a las 24 horas en una concentración de 20 ug/ml.

Ejemplo 7 - Protocolo de ensayo de migración

Se cultivaron las células HUVEC en EGM2 + todos los suplementos de Clonetics (nº cat. CC-4176) sobre placas de 24 pocillos revestidas con fibronectina hasta la confluencia. Las células en el centro de cada pocillo se rasparon con una punta de pipeta de 2 µl, y se retiraron las células en la cicatriz cuando se lavaron. El medio de cultivo celular con el anticuerpo de control, o 7H5 o 7H12 se añadió a diferentes pocillos. Todos los anticuerpos ensayados se utilizaron a 20 µg/ml. Se permitió entonces crecer las células durante 1 a 2 días. Se controlaron las zonas de herida. La Figura 6 muestra una fotografía de la migración de HUVEC en 5 ug/ml de fibronectina con 20 ug/ml de anticuerpos anti-alfa5 (7H5) en ECM-2 a las 0 horas y 30 horas. La Figura 7 es un gráfico del % de migración a las 30 horas por las células tratadas con los anticuerpos 7H5 o 7H12.

Ejemplo 8 - Ensayos de inmunotinción de caspasa-3 de apoptosis en HUVEC activadas

Las placas de 96 pocillos se revistieron con fibronectina (1 µg/ml) durante una noche. Las placas se lavaron con PBS. Luego se colocaron en placas de 3000-5000 células por 96 pocillos y se cultivaron una noche en medio completo (medio EBM-2 (Cambrex CC-3156) con el EGM-2 SingleQuots (Cambrex CC-4176). Si se usaran las células endoteliales 2H-11 de ratón para el ensayo de apoptosis, entonces el medio es un medio 50/50 con un 10 % de PBS.

El día siguiente, un grupo de pocillos se cambió por medio libre de suero y se incubó durante 4-6 horas para privar las células y ponerlas en un estado no proliferativo. El otro grupo de células se mantuvo en medio completo y representaban las células proliferantes activamente. Tras 4-6 horas, se añadieron los anticuerpos (incluyendo los isotipos de control). En general, se utilizaron 3 pocillos para cada condición. Las células se incubaron entonces con los anticuerpos durante 1-48 horas. Los anticuerpos anti-integrina alfa5betal se ensayaban en general a las siguientes concentraciones: 0 µg/ml, 4 µg/ml, 16 µg/ml, 60 µg/ml y 120 µg/ml.

Tras esta incubación, las células se fijaron con un 4 % de PFA, se bloquearon con un 10 % de suero de cabra (PBS con 0,2 % de Triton) durante 1-2 horas y luego se tiñeron con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la forma activada de la Caspasa 3 (por ejemplo, anticuerpo anti-Caspasa-3 activa de conejo de BioVision, diluido 1:50 en PBS con un 0,2 % de Triton y un 5 % de suero de cabra). El anticuerpo anti-caspasa 3 y las células fijadas se incubaron una noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un segundo anticuerpo antirratón conjugado con Alexa-594 durante 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Los pocillos se lavaron de nuevo y se incubaron con DAP (1:10000 en PBS) durante 10 min. Tras un lavado final con PBS, se hizo un recuento del número celular total por pocillo tomando una foto de la tinción con DAPI a 5x. Las células que eran positivas para la caspasa activada en los mimos campos se fotografiaron utilizando el filtro rojo. Se evaluó la apoptosis como el porcentaje de células positivas para la caspasa 3 activada. Los resultados se analizaron entonces utilizando Excel. La Figura 8 muestra que 7H5 y 7H 12 no inducen activamente apoptosis.

Ejemplo 9 - Ensayo colorimétrico de la actividad de Caspasa-3/7 en HUVEC

El ensayo de actividad de caspasa 3/7 se llevó a cabo utilizando los anticuerpos 7H5 y 7H12 (Ensayo Apo-One Caspasa 3/7 de Promega, véase Boletín técnico N° 295 para instrucciones de un ensayo de 96 pocillos de referencia).

En general, se revistieron placas de 96 pocillos con fibronectina (1 µg/ml) durante una noche. Las placas se lavaron con PBS. Luego se colocaron en placas de 3000-5000 células por 96 pocillos y se cultivaron una noche en medio completo (medio EBM-2 (Cambrex CC-3156) con el EGM-2 SingleQuots (Cambrex CC-4176). Si se usaran las células endoteliales 2H-11 de ratón para el ensayo de apoptosis, entonces el medio es un medio 50/50 con un 10 % de PBS.

El día siguiente, un grupo de pocillos se cambió por medio libre de suero y se incubó durante 4-6 horas para privar las células y ponerlas en un estado no proliferativo. El otro grupo de células se mantuvo en medio completo y representaban las células proliferantes activamente. Tras 4-6 horas, se añadieron los anticuerpos (incluyendo los isotipos de control). En general, se utilizaron 3 pocillos para cada condición. Las células se incubaron entonces con los anticuerpos durante 1-48 horas. Los anticuerpos anti-integrina alfa5betal se ensayaban en general a las siguientes concentraciones: 0 µg/ml, 4 µg/ml, 16 µg/ml, 60 µg/ml y 120 µg/ml.

Tras esta incubación se añadieron 100 µl del reactivo Apo-One Caspasa 3/7 a cada pocillo, y la placa se mezcló cuidadosamente utilizando un agitador de placas a 300 rpm durante 30 segundos. La placa entonces se incubó a temperatura ambiente durante 1 a 8 horas y entonces se utilizó un lector de placas. Se midió la fluorescencia de cada pocillo con una longitud de onda de 485 nm y una emisión de 530 nm.

La señal fluorescente (RLU) resultante de la escisión del sustrato de la caspasa 3/7 indicaba apoptosis. La Figura 9 muestra que 7H5 y 7H12 no inducen apoptosis activamente.

Ejemplo 10 - Ensayo de formación de tubos

Se pueden evaluar los anticuerpos anti-alfa5beta1 en cuanto a su capacidad para inhibir la formación de tubos. El siguiente es un ejemplo de un ensayo de formación de tubos basado en el ensayo de crecimiento de HUVEC y formación de tubos descrito en Nakatsu et al. (2003) Microvascular Research 66 (2003) 102-112.

En general, las células HUVEC se pueden mezclar con microportadores Cytodex recubiertos de detrano (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a una concentración de 400 HUVEC por perla en 1 ml de medio EGF-2. Las perlas con las células se pueden agitar con cuidado cada 20 minutos durante 4 horas a 37 °C y un 5 % de CO₂. Al día siguiente, las perlas con las células se lavaron tres veces con 1 ml de EGM-2 y se resuspendieron a una concentración de perlas revestidas con 200 células/ml de fibrinógeno (Sigma, St. Louis, MO). Se añaden quinientos microlitros de solución fibrinógeno/perlas a 0,625 unidades de trombina (Sigma) en un pocillo de la placa de cultivo tisular de 24 pocillos. La solución fibrinógeno/perlas se coagula durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 20 minutos. Se añade un mililitro de EGM-2 (que contiene un 2 % de FBS) a cada pocillo y se equilibra con el coágulo de fibrina durante 30 minutos a 37 °C y un 5 % de CO₂. El medio se retira del pocillo y se reemplaza con 1 ml de medio reciente. Aproximadamente, veinte mil células de fibroblastos cutáneos (Detroit 551, ATCC, Rockville, MD) se colocan en las placas en la parte superior del coágulo. El medio se puede cambiar día sí día no. Los ensayos con perlas se controlan 7 días.

Las perlas revestidas de HUVEC se cultivan en geles de fibrina con o sin 500 µl de anticuerpos anti-alfa5beta1 (7H5 y 7H12) en la parte superior del gel durante 2-3 días y luego se transfieren a la plataforma de un NIcon Eclipse TE300, equipado con ejes multidimensionales y se mantienen a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 72 h. La concentración final de anticuerpo que se va a utilizar se puede calcular teniendo en cuenta el volumen del gel de fibrina, es decir, la concentración final de anticuerpo = peso de anticuerpo total/volumen de medio + volumen de gel de fibrina. Se pueden capturar imágenes de múltiples perlas cada 20 minutos utilizando el software Metamorph. La cuantificación de los vasos in vitro se pueden conseguir utilizando imágenes de las perlas de alta resolución (por ejemplo microscopio IX70 Olympus con un objetivo 4x). El número de brotes por perla se puede determinar comparándolos con un control (sin tratar), en que el brote se puede definir como un vaso de longitud igual al diámetro de la perla. La longitud del brote se puede medir con unidades arbitrarias.

Ejemplo 11 - Estudios de combinación en modelos tumorales de xenoinjertos/aloinjertos

La administración concurrente y secuencial de terapia antagonista alfa5beta1 y terapias antagonistas VEGF se pueden evaluar en modelos tumorales de xenoinjertos/aloinjertos. Preferentemente, los modelos tienen muy poca o ninguna respuesta a la monoterapia antagonista con VEGF. Los siguientes son ejemplos de modelos que se pueden utilizar: (a) aloinjerto Fo5 en ratones desnudos atímicos (tumor de mama derivado de los ratones transgénicos mmtv-Her2) (Finkle, D., et al., (2004) Clin. Cancer Res. 10:2499-2511); (b) xenoinjerto HT29 en ratones desnudos atímicos (línea colorrectal humana); y (c) RIP-TbAg (tumores pancreáticos en un modelo Tg). Se pueden administrar las terapias normalmente por vía intraperitoneal, subcutánea, o intravenosa. Por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF

puede administrarse a 10 mg/kg una vez por semana o 5 mg/kg dos veces por semana. La cantidad de antagonista alfa5beta1, tal como un anticuerpo, que se va a administrar se puede estimar basándose en su afinidad y actividad. En un experimento, el antagonista VEGF y el antagonista alfa5beta1 se puede administrar en una programación simultánea durante 5-6 semanas. De manera alternativa o adicionalmente, el antagonista VEGF y el antagonista alfa5beta1 se pueden administrar secuencialmente (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF durante tres semanas seguido por dosificación con anticuerpo anti-alfa5beta1 durante tres semanas).

La eficacia del tratamiento se puede evaluar basándose, entre otras cosas, en la progresión tumoral, perfusión tumoral, densidad vascular tumoral, morfología y/o supervivencia. La progresión tumoral se puede medir, por ejemplo, volumen tumoral y/o pesos tumorales. Se pueden utilizar la perfusión de lecitina-FITC, así como tinción con marcador vascular para evaluar los cambios vasculares concomitantes con la progresión neoplásica.

Ejemplo 12 - Modelo de tumor de mama humano MDA-MB231

Se inyectaron ratones desnudos hembras HRLN con 5×10^6 de células de cáncer de mama MDA-Mb231 humano por vía subcutánea en el flanco. (HRLN es un nombre de cepa). Se permitió crecer a los tumores hasta que alcanzaban un tamaño medio de 80-120 mm cúbicos. Los ratones que portaban el tumor se dividieron en 4 grupos y se empezó el tratamiento cuando la media de volumen tumoral por grupo era de ~100 mm cúbicos.

Los volúmenes tumorales se midieron dos veces a la semana durante el estudio. La medición del volumen se llevó a cabo utilizando un método de medición con calibre de referencia. El mab anti ratón integrina alfa5 de hámster, conocido como 10E7, se generó en Genentech. El punto final del experimento se alcanzó cuando el tumor tenía 1,5 g o habían pasado 60 días, lo que sucediera primero. Los que responden pueden haberse seguido más tiempo en algunos casos. Los animales se sometieron a eutanasia cuando se alcanzó el punto final.

Los detalles del tratamiento se describen a continuación:

(1) Grupo de control: mab de control anti-ambrosía inyectado (10 mg/kg, vía intraperitoneal (ip), una vez a la semana)

(2) Grupo del agente simple anti-VEGF: mab anti-VEGF B20.4.1 inyectado (10 mg/kg, ip, una vez a la semana)

(3) Grupo de combinación: B20.4.1 (10 mg/kg, ip, una vez a la semana) más mab anti-ratón integrina alfa5 10E7 de hámster (10 mg/kg, ip, dos veces por semana)

(4) Grupo de agente simple anti-integrina alfa5: mab anti-ratón integrina alfa5 10E7 de hámster (10 mg/kg, ip, dos veces por semana)

Datos del grupo de control:

Día del estudio	1 TV (mm3)	4 TV (mm3)	9 TV (mm3)	13 TV (mm3)	16 TV (mm3)	20 TV (mm3)	23 TV (mm3)	27 TV (mm3)
ID Animal								
1	63	75	196	405	550	486	600	1080
2	63	75	126	196	320	320	446	527
3	75	126	288	666	666	936	1080	2048
4	75	126	196	320	320	446	527	936
5	75	326	288	446	486	787	908	1764
6	88	144	221	288	288	405	5S0	550
7	88	144	320	550	726	1008	13S2	2025
8	88	144	144	446	600	1268	1268	1913
9	108	144	345	486	650	700	908	1437
10	144	162	320	527	527	847	1352	2138
Media	86,5	126,6	234,4	432,8	513,2	720,2	898,9	1441,6
SEM	7,7	9,3	22	43,5	49,7	96,6	112,3	198,2
N	10	10	10	10	10	10	10	10

ES 2 544 957 T3

Datos del grupo de agente único anti-VEGF

Día del estudio ID Animal	1 TV (mm3)	4 TV (mm3)	9 TV (mm3)	13 TV (mm3)	16 TV (mm3)	20 TV (mm3)	23 TV (mm3)	27 TV (mm3)
1	63	108	144	320	405	550	256	500
2	63	63	100	162	221	288	288	550
3	75	196	365	405	500	320	500	550
4	75	75	196	256	288	500	550	1099
5	75	126	196	320	500	500	550	787
6	88	144	221	320	352	446	446	600
7	88	196	365	405	405	666	726	864
8	88	196	288	320	352	384	288	365
9	108	172	256	500	405	320	288	320
10	144	245	416	567	750	968	1296	1296
Media	86,5	152	254,6	357,5	417,8	494,1	518,8	693
SEM	7,7	18,7	32,6	36,9	45,8	64,5	99,1	100
N	10	10	10	10	10	10	10	10

Datos anti-VEGF y anti-Alfa5Beta1:

Día del estudio ID Animal	1 TV (mm3)	4 TV (mm3)	9 TV (mm3)	13 TV (mm3)	16 TV (mm3)	20 TV (mm3)	23 TV (mm3)	27 TV (mm3)
1	63	63	63	63	63	108	126	108
2	63	108	172	256	288	288	288	288
3	75	126	126	221	245	245	320	320
4	75	75	75	126	196	288	245	446
5	75	108	172	405	352	650	650	908
6	88	196	221	320	320	288	196	196
7	88	75	196	256	196	288	288	446
8	88	88	144	320	320	288	320	405
9	108	126	144	196	256	320	320	486
10	144	231	270	446	600	650	600	787
Media	86,5	118,5	158,1	260,8	283,6	341,3	335,3	438,8
SEM	7,7	16,5	19,9	37,3	44	54,7	52,2	78,1
N	10	10	10	10	10	10	10	10

Datos del grupo de agente simple Anti-integrina alfa5

Día del estudio ID Animal	1 TV (mm3)	4 TV (mm3)	9 TV (mm3)	13 TV (mm3)	16 TV (mm3)	20 TV (mm3)	23 TV (mm3)	27 TV (mm3)
1	63	75	196	320	486	787	1008	2025
2	63	108	126	365	365	726	1008	1352
3	75	75	144	288	288	550	600	1008

4	75	108	144	320	320	847	1152	1960
5	75	108	172	365	365	550	486	1152
6	88	196	352	650	787	908	1352	1666
7	88	100	162	245	352	486	1764	TP el 08/12/06, tumor supera 1500 mm3
8	88	126	162	320	446	486	650	650
9	108	288	446	600	1008	1352	936	3179
10	144	162	245	384	352	486	486	288
Media	86,5	134,6	214,8	385,6	476,7	717,7	944,2	1475,6
SEM	7,7	20,7	33,1	42	74,2	86,7	129,7	286,4
N	10	10	10	10	10	10	10	9

Estos datos preliminares muestran signos tempranos de actividad combinada anti-alfa5 + anti-VEGF.

A continuación del punto final del estudio, se calcularon los volúmenes tumorales medios para cada grupo (Figura 11A). Las curvas de Kaplan-Meier se construyeron también para mostrar el porcentaje de animales que permanecían en el estudio en función del tiempo (Figura 11B). Los datos muestran que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ aumenta la eficacia del anti-VEGF en un modelo de cáncer de mama.

Ejemplo 13 - 7H12 y Bevacizumab en el modelo de curación de herida en la oreja

Se pesaron y anestesiaron con isoflurano conejos blancos Nueva Zelanda. En cada conejo, se recortó el pelo de la superficie interna a lo largo de los extremos de ambas pinnae auriculares. Se retiró cualquier pelo remanente de los sitios quirúrgicos con loción depilatoria. Los sitios quirúrgicos se limpiaron frotando con betadine y aclarando con alcohol. Utilizando una técnica aséptica, se utilizó un troquel circular de 8 mm para producir una herida profunda en el cartílago auricular en cada oreja. Se retiró el pericondrio restante con un elevador de periostio y unas tijeras finas. Se colocó un vendaje adhesivo Opsite® sobre cada herida, y se dejó que el conejo se recuperara de la anestesia. Los vendajes Opsite® se retiraban a diario, se inspeccionaban las heridas, se aplicaban los tratamientos tópicamente, y se aplicaba un vendaje nuevo. El hueco de la herida se calculó midiendo el diámetro los días 0 (inmediatamente después de la cirugía), 7, 10, 14, y 18.

Los grupos de tratamiento eran:

- Bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF) 100 ug en 30 ul a cada herida diariamente (n = 4)
- 7H12 (anticuerpo anti-alfa5beta1) 100 ug en 30 ul a cada herida diariamente (n = 4)
- Bevacizumab 100 ug en 15 ul + 7H12 100 ug en 15 ul a cada herida diariamente (n = 4)
- Trastuzumab (anticuerpo anti-HER2) 100 ug en 30 ul a cada herida diariamente (n = 3)

Los datos muestran que las terapias de combinación con el anti-VEGF y el anti-alfa5beta1 tiene un notable efecto en este modelo de angiogénesis frente a los agentes simples solos (FIG.10).

Ejemplo 14 - Terapia de combinación anti-alfa5beta1 y anti-VEGF en cáncer de colon

Se inyectaron ratones hembra HRLN nu/nu con 1 mm³ de fragmentos de tumor HT29 (tumor de colon) por vía subcutánea en sus flancos. Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaban un tamaño medio de 80-120 mm³ cúbicos antes del tratamiento con las terapias. Los ratones que portaban los tumores se dividieron en 4 grupos:

Grupo	Nº de ratones	Regimen de tratamiento 1				Regimen de tratamiento 2			
		Agente	mg/kg	Vía	Programac.	Agente	mg/kg	Vía	Programac.
1	10	Control	10	IP	Cada sem. x 7	PBS	-	IP	Bisem. x 7
2	10	B20-4.1	10	IP	Cada sem. x final	PBS	-	IP	2x/sem. Hasta el final
3	10	B20-4.1	10	IP	Cada sem. x final	10E7	10	IP	2x/sem. Hasta el final
4	10	PBS	-	IP	-	10E7	10	IP	2x/sem. Hasta el final

La medición del volumen tumoral se llevó a cabo dos veces por semana utilizando un método de medición con calibre de referencia. El mab anti-ratón integrina alfa5 de hámster, conocido como 10E7, se generó en Genentech.

La IgG de control era un anticuerpo monoclonal anti-ambrosía. Se midió el peso corporal 5 veces durante 2 días y luego dos veces por semana (bisem) hasta el final del estudio. El punto final del experimento era un volumen tumoral de 1 g o 90 días, lo que sucediera antes. Algunos de los que respondían se siguieron más tiempo.

Cuando se alcanzaba el punto final, los animales se sometieron a eutanasia. El volumen de dosificación era de 10 ml/kg (0,20 mg/20 g de ratón), cuyo volumen se ajustó por peso corporal. En los animales que mostraban una remisión completa (CR), se recolectaron los tejidos en el sitio de implantación del tumor en el punto final y se conservaron en formalina seguida por un 70 % de EtOH para estudios posteriores. Todas las muestras que se iban a congelar se colocaron en un criomolde, envueltos en hojas y congelados de forma instantánea en nitrógeno líquido.

A continuación del punto final del estudio, se calculó la media de los volúmenes tumorales para cada grupo (Figura 12A). También se construyeron las curvas de Kaplan-Meier para mostrar el porcentaje de animales que permanecían en el estudio en función del tiempo (Figura 12B). Los datos muestran que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ aumenta la eficacia del anti-VEGF en un modelo de cáncer de colon.

Ejemplo 15 - Anti-alfa5betal + quimioterapia en un cáncer de colon

Se inyectaron ratones hembra HRLN nu/nu con 5×10^6 células tumorales BCT116 (células de tumor de colon) por vía subcutánea en sus flancos. Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaban un tamaño medio de 80-120 mm³ antes del tratamiento con las terapias. Los ratones que portaban los tumores se dividieron en 4 grupos:

Grupo	Nº de ratones	Regimen de tratamiento 1				Regimen de tratamiento 2			
		Agente	mg/kg	Vía	Programac.	Agente	mg/kg	Vía	Programac.
1	10	PBS	-	IP	Bisem. x 7	-	-	IP	-
2	10	10E7	10	IP	Bisem. x 7	-	-	IP	-
3	10	PBS	-	IP	Bisem. x 7	irinotecan	100	IP	Cada sem. x 3
4	10	10E7	10	IP	Bisem. x 7	irinotecan	100	IP	Cada sem. x 3

La medición del volumen tumoral se llevó a cabo dos veces por semana utilizando un método de medición con calibre de referencia. El mab anti-ratón integrina alfa5 de hámster, conocido como 10E7, se generó en Genentech. El peso corporal se midió 5 veces durante 2 días y luego dos veces por semana (bisem) hasta el final del estudio. El punto final del experimento era un volumen tumoral de 1,5 g o 60 días, lo que sucediera antes. Algunos de los que respondían se siguieron más tiempo. Cuando se alcanzaba el punto final, los animales se sometieron a eutanasia. El volumen de dosificación era de 10 ml/kg (0,200 mg/20 g de ratón), cuyo volumen se ajustó por peso corporal. Se administró 10E7 30 minutos antes de la administración de irinotecan. En los animales que muestran una regresión completa (CR), se recolectaron los tejidos en el sitio de implantación del tumor en el punto final y se conservaron en formalina seguida de un 70 % de EtOH para estudios posteriores. Todas las muestras que se iban a congelar se colocaron en un criomolde, envueltos en una hoja y congelado de manera inmediata en nitrógeno líquido.

A continuación del punto final del estudio, se calculó la media de los volúmenes tumorales para cada grupo (Figura 13A). También se construyeron las curvas de Kaplan-Meier para mostrar el porcentaje de animales que permanecían en el estudio en función del tiempo (Figura 13B). Los datos muestran que un anticuerpo anti-integrina alfa5beta1 no aumentaba la eficacia de la actividad de un agente quimioterápico (irinotecan) en un modelo de cáncer de colon, pero tampoco dificulta la actividad del agente quimioterápico. Esta observación es consistente con la creencia de los inventores de que el daño vascular solo se produciría antes de que la terapia con alfa5beta1 pueda ser significativamente útil en la anti-angiogénesis, en general, y en la anti-angiogénesis en particular en un cuadro oncológico. Tal daño vascular puede producirse por un antagonista VEGF, tal como el anticuerpo AVASTIN®. Por sí mismo, el agente quimioterápico en este modelo no producía un daño vascular significativo. Se puede tener en cuenta el uso de los agentes (antagonista VEGF/antagonista alfa5beta1/agente quimioterápico) simultáneo o secuencial, de forma que el antagonista VEGF esté presente para producir el daño vascular.

Ejemplo 16 - Gráficos Scatchard de alfa5beta1

Los anticuerpos anti-alfa5betal se yodaron utilizando el método de Iodogen, y el anticuerpo radiomarcado se purificó del ¹²⁵I-Na por filtración en gel utilizando una columna PD-10. Se sembraron células R9ab, una línea celular de fibroblastos de conejo (adquirida en la ATCC, Nº CCL-193) a ~ 50.000 por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 48 h en un 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón de unión (50:50 medio DMEM/F12 que contenía un 2 % de FBS y 50 mM de HEPES, pH 7,2) y luego se incubaron en hielo durante 15 minutos. Las células lavadas se incubaron 4 horas en hielo con aproximadamente 50 pM de un anticuerpo monoclonal anti-alfa5beta1 ¹²⁵I que contenía concentraciones descendentes de anticuerpo monoclonal anti-

alfa5beta1 sin marcar diluidas en serie desde 0,5 uM en tampón de unión para 13 concentraciones por triplicado. Las células se lavaron tres veces con tampón de unión y luego se solubilizaron con 200 ul de tampón de lisis SDS (1 % de SDS, 8 M de urea, 100 mM de glicina, pH 3,0). Se hizo un recuento de los lisados celulares con un contador gamma Wallac Wizard 1470. Los datos de unión se evaluaron utilizando el programa NewLigand de Genentech, que utiliza un algoritmo de ajuste a la curva de Munson y Robard (Munson, P. y Robard, D. (1980) Anal. Biochem. 107: 220-239) para determinar la afinidad de unión del anticuerpo y la concentración de sitios de unión. Las figuras 14 y 15 muestran que el anticuerpo 7H5 tiene una Kd de 0,10 nM y el anticuerpo 7H12 tiene una Kd de 0,30 nM, respectivamente, en estos ensayos de unión.

10 **Ejemplo 17 - Ensayos de unión competitiva/mapeo de epítomos de IgG anti-integrina alfa5beta1**

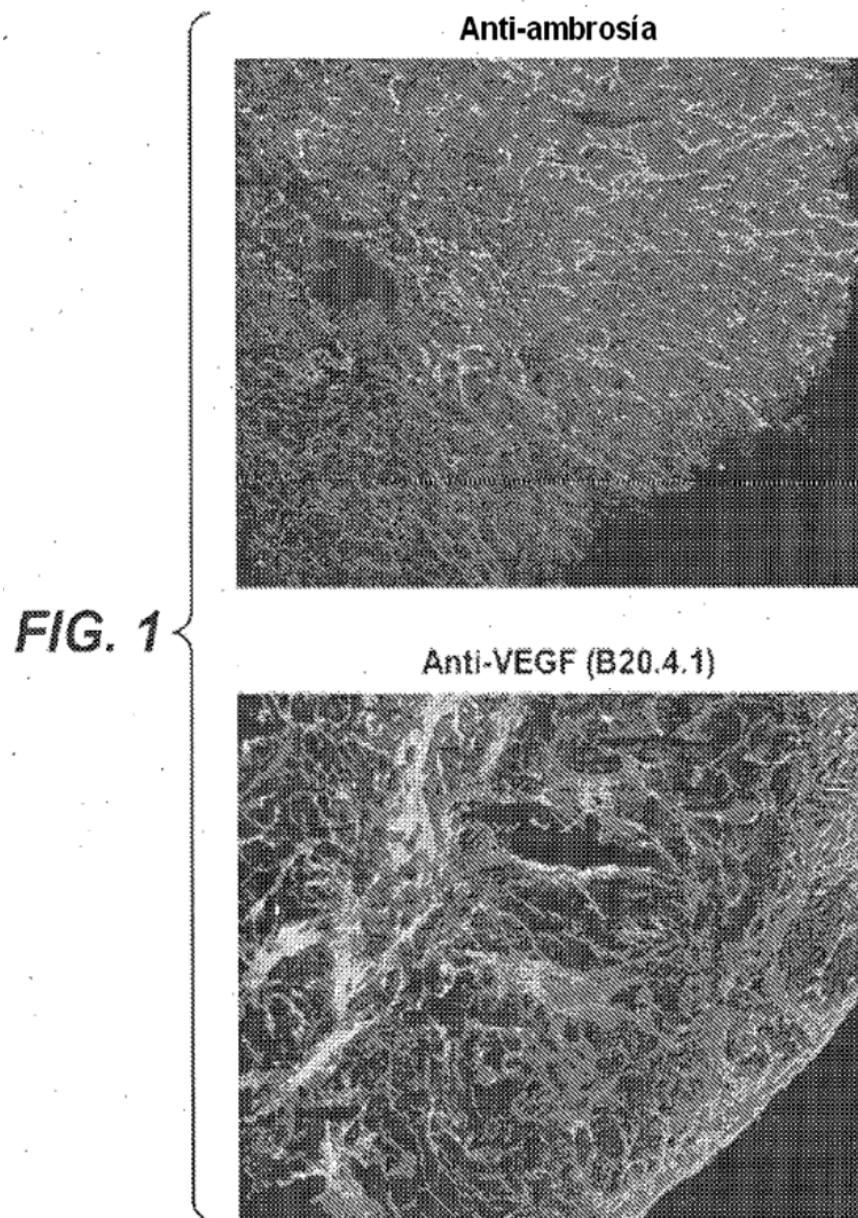
Primero se incubaron diluciones de tres veces seriadas de IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ en placas Maxisorp Nunc de 96 pocillos revestidas con el antígeno integrina $\alpha 5\beta 1$ humana (1 ug/ml; R&D) en tampón PBST (PBS y 0,5 % (p/v) de BSA y 0,05 % (v/v) de Tween 20) durante 1-2 h a temperatura ambiente, seguido por la adición de 0,3 nM de hlgG1 h7H5.v1 biotinilada (un anticuerpo variante de 7H5 generado por Genentech, Inc.), que se determinó primero por señal de unión sub-máxima (50-70 %)), durante 15 minutos. Luego se lavó la placa con tampón PBT (PBS y 0,05 % (v/v) Tween20) 5 veces. La hlgG1 h7H5.v1 biotinilada se detectó con conjugado de estreptavidina peroxidasa de rábano rusticano (Pierce) diluido 1:2500 en tampón PBST, se desarrolló con el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) durante aproximadamente 5 minutos, se inactivó con 1,0 M de H_3PO_4 , y se leyó espectrofotométricamente a 450 nm. Se ajustaron las curvas con un programa de ajuste de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software).

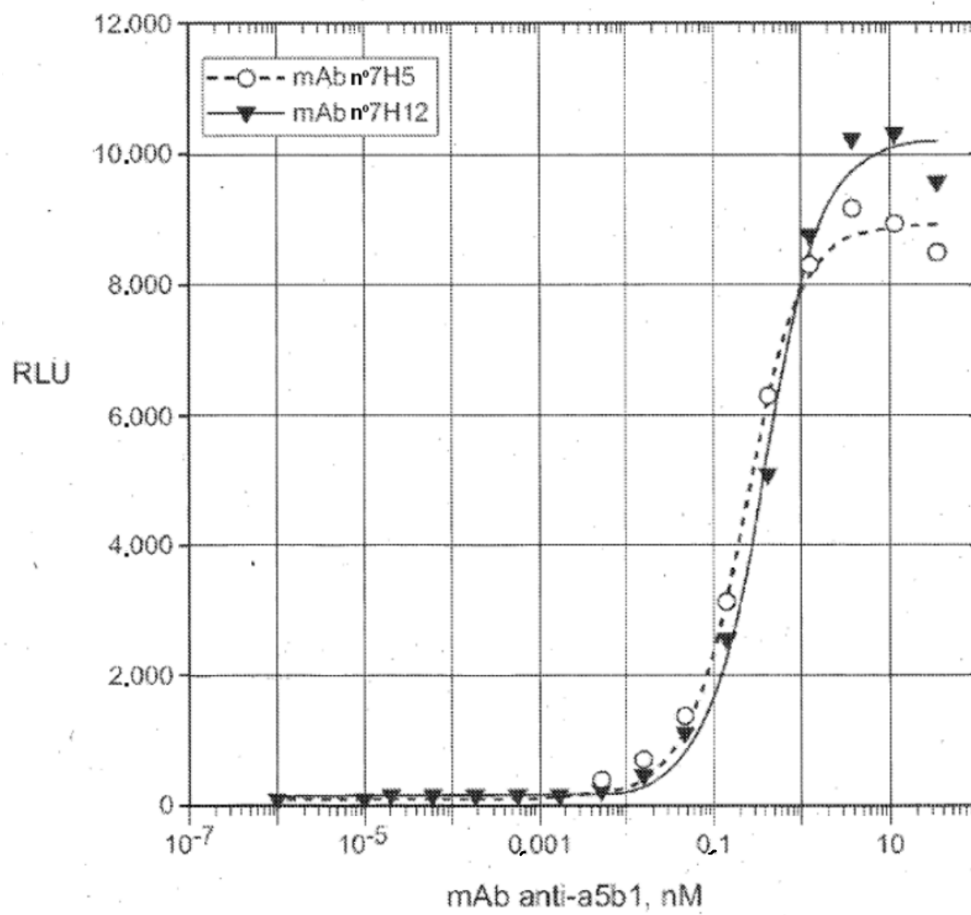
La Figura 16 muestra que el h7H5.v1 unido competía con cantidades crecientes de m7H12 frío. De hecho la curva de competición de m7H5 era casi idéntica a la curva de competición de h7H5.v1 (datos no mostrados). El m7H12 frío también competía con biotina-h7H5.v1 por la unión a alfa5beta1, lo que indicaba que el h7H5.v1 y m7H12 que se unen a epítomos de alfa5beta1 se solapan. El anticuerpo de control, por otra parte, no compete con el h7H5.v1 unido.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-VEGF antagonista, para su uso en un método para tratar una enfermedad que tiene una angiogénesis excesiva en un sujeto,
- 5 administrando un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista y el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista se administran en ciclos de tratamiento concurrentes.
2. Un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, para su uso en un método para tratar una enfermedad que tiene una
- 10 angiogénesis excesiva en un sujeto, administrando un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista y el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista se administran en ciclos de tratamiento concurrentes.
3. Un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, para su uso en un método para
- 15 tratar una enfermedad que tiene una angiogénesis excesiva en un sujeto, administrando un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista y el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista se administran en ciclos de tratamiento concurrentes.
- 20 4. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al sujeto se le administra además un agente terapéutico que se selecciona de entre el grupo que consiste en un agente anti-neoplásico, un agente quimioterápico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico.
- 25 5. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor, o una enfermedad autoinmunitaria, o en donde el sujeto tiene niveles elevados de alfa5beta1 en un tejido enfermo en comparación con el tejido de un sujeto que no padece la enfermedad.
- 30 6. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor sólido, un tumor metastásico, un tumor de tejidos blandos, una enfermedad que tiene neovascularización ocular, una enfermedad inflamatoria que tiene una angiogénesis excesiva, una enfermedad que tiene una
- 35 angiogénesis excesiva que aparece tras un trasplante en el sujeto y una enfermedad que tiene una proliferación anormal de tejido fibrovascular.
7. El anticuerpo anti-VEGF y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las
- 40 reivindicaciones 1-4, en donde la enfermedad es un cáncer, enfermedad ocular, o enfermedad autoinmunitaria.
8. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con la
- reivindicación 7, en donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer de
- 45 cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer celular renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer ovárico, mesotelioma, cáncer de tejidos blandos y mieloma múltiple.
9. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con una
- 50 cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en retinopatía, degeneración macular inducida por la edad, rubeosis; psoriasis, artritis psoriásica, una enfermedad renal inflamatoria, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética, artritis, enfermedad intestinal inflamatoria, inflamación crónica, desprendimiento de retina crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, miopía, enfermedad
- 55 neovascular ocular, osteoartritis, enfermedad de Paget, penfigoide, poliarteritis, queratotomía radial post-láser, neovascularización retiniana, síndrome de Sjogren, colitis ulcerativa, rechazo de injertos, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, edema, ascitis asociada a enfermedades malignas, ictus, angiofibroma y glaucoma neovascular.
10. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con
- una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista está conjugado
- 60 con un agente citotóxico.
11. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con la
- reivindicación 10, en donde el agente citotóxico es un isótopo radioactivo, un agente quimioterápico o una toxina.
12. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con
- 65 una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista es un anticuerpo humanizado o humano.

13. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el donde el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista es un anticuerpo humanizado o humano.
- 5 14. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista puede inhibirse competitivamente de la unión al VEGF humano por el bevacizumab.
- 10 15. El anticuerpo anti-VEGF antagonista y/o el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista es bevacizumab.
- 15 16. Uso de un anticuerpo anti-VEGF antagonista en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad que tiene una angiogénesis excesiva en un sujeto mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista y el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista se administran en ciclos de tratamiento concurrentes.
- 20 17. Uso de un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad que tiene una angiogénesis excesiva en un sujeto mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista y el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista se administran en ciclos de tratamiento concurrentes.
- 25 18. Uso de un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad que tiene una angiogénesis excesiva en un sujeto mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF antagonista y un anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista y el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista se administran en ciclos de tratamiento concurrentes.
- 30 19. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en donde el anticuerpo anti-VEGF antagonista, el anticuerpo anti-alfa5beta1 antagonista, el sujeto y/o la enfermedad son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 4-15.



**FIG. 2**

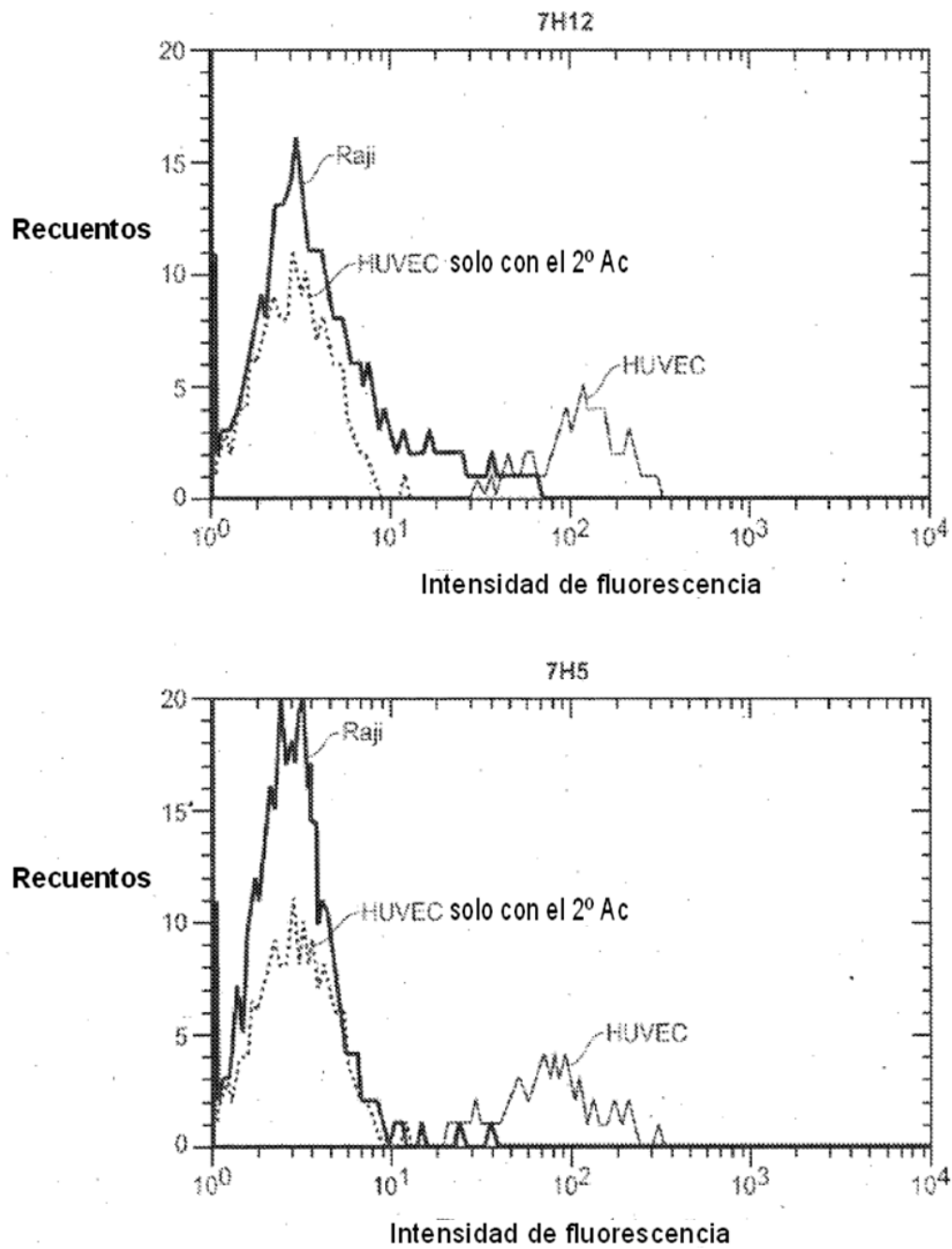
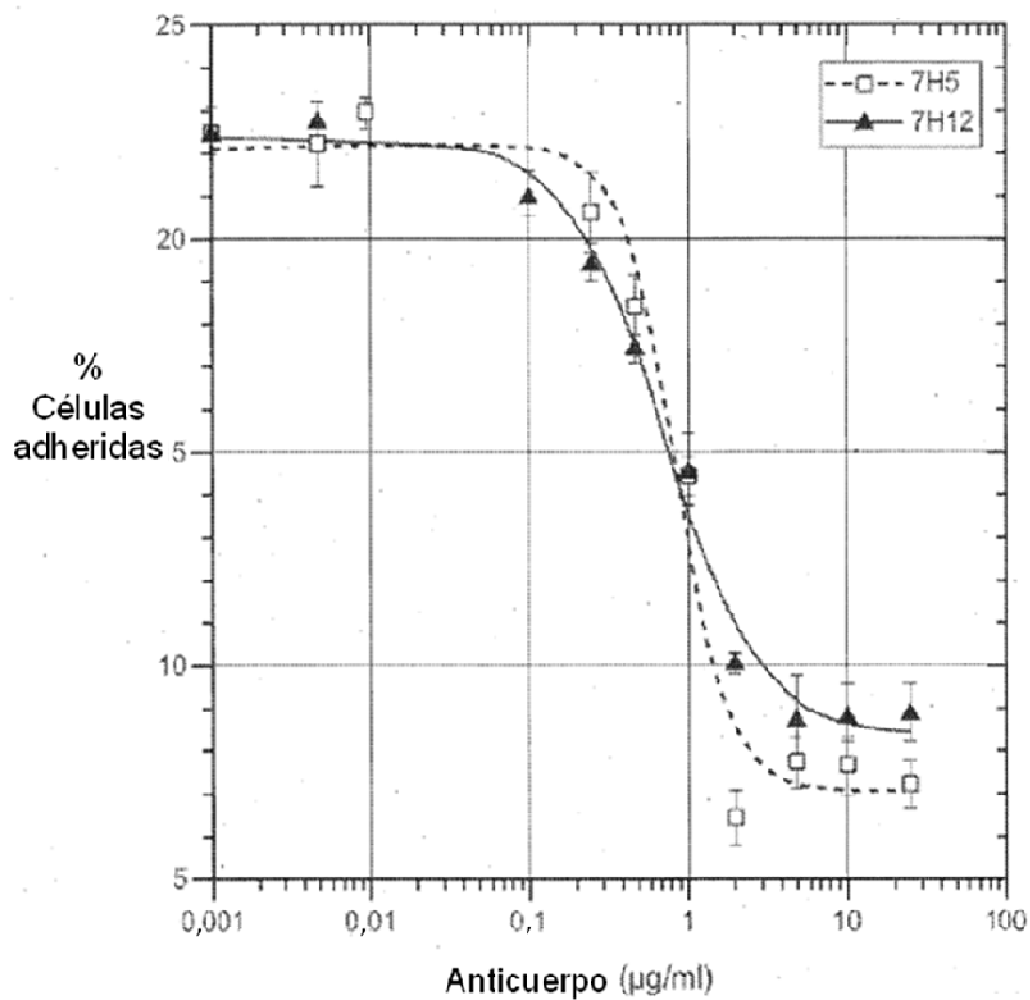


FIG. 3

**FIG. 4**

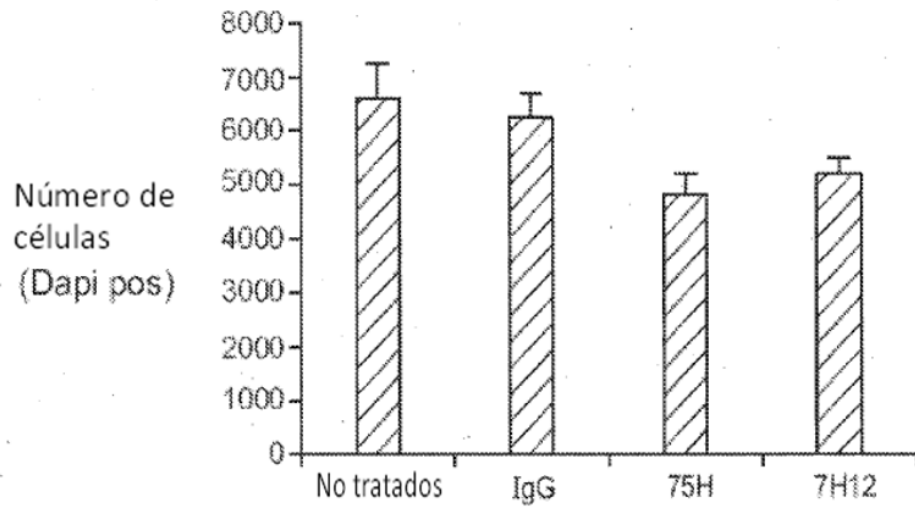


FIG. 5A

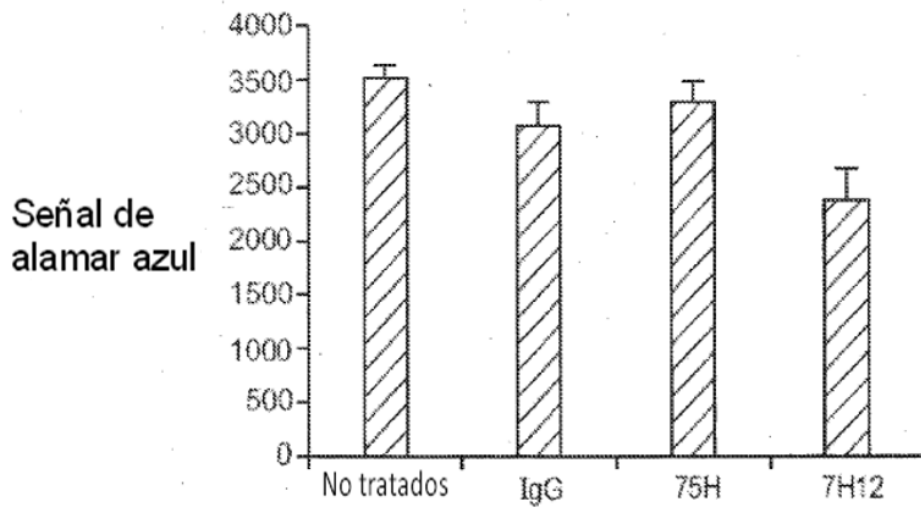
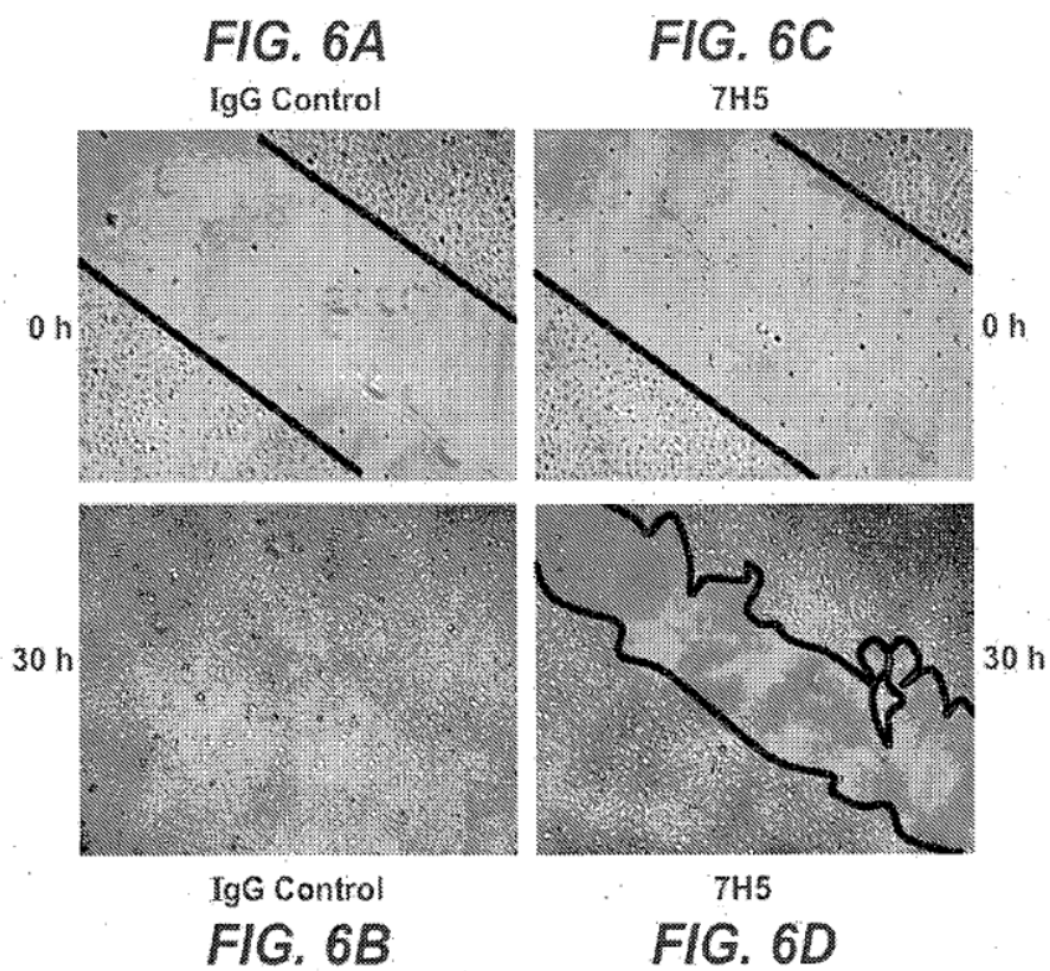
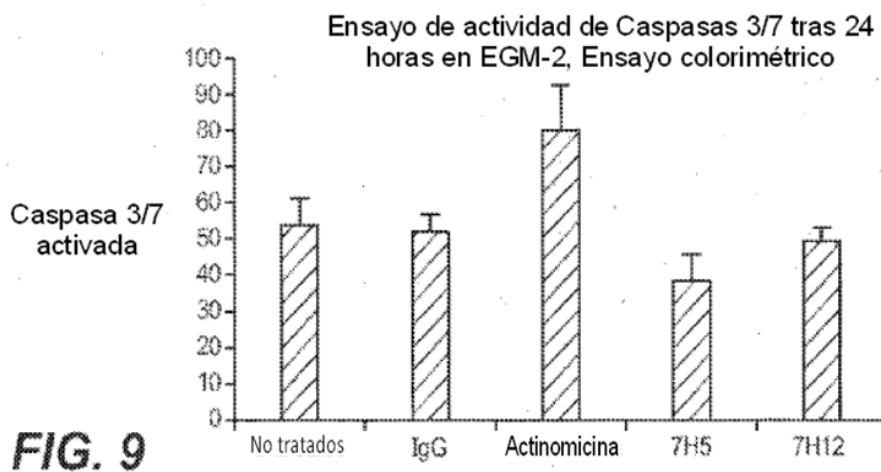
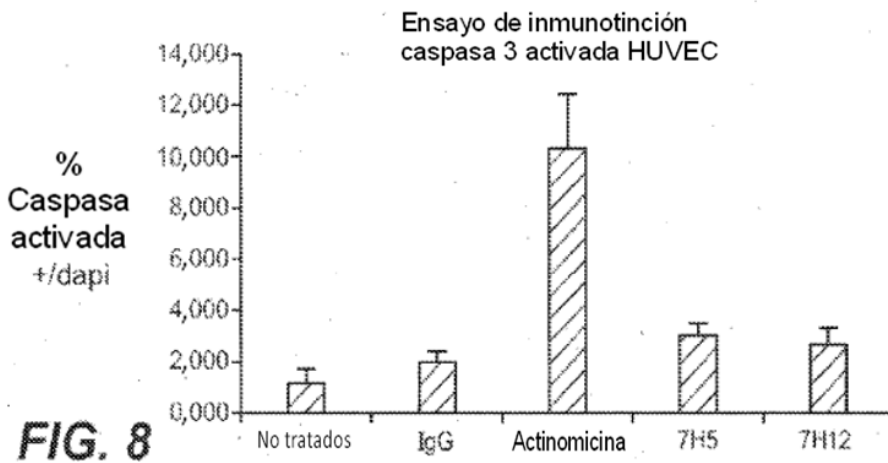
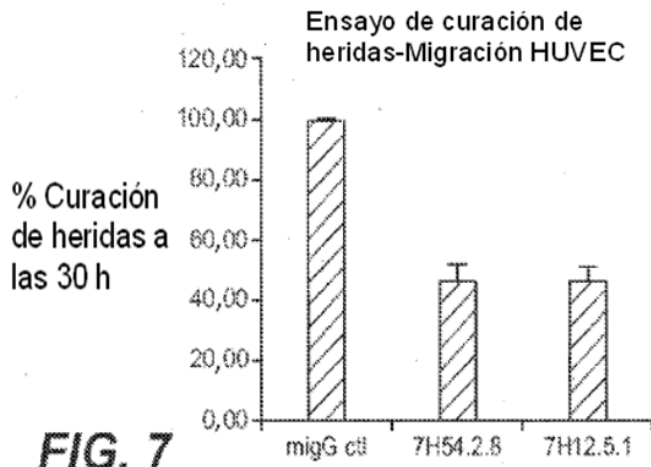


FIG. 5B





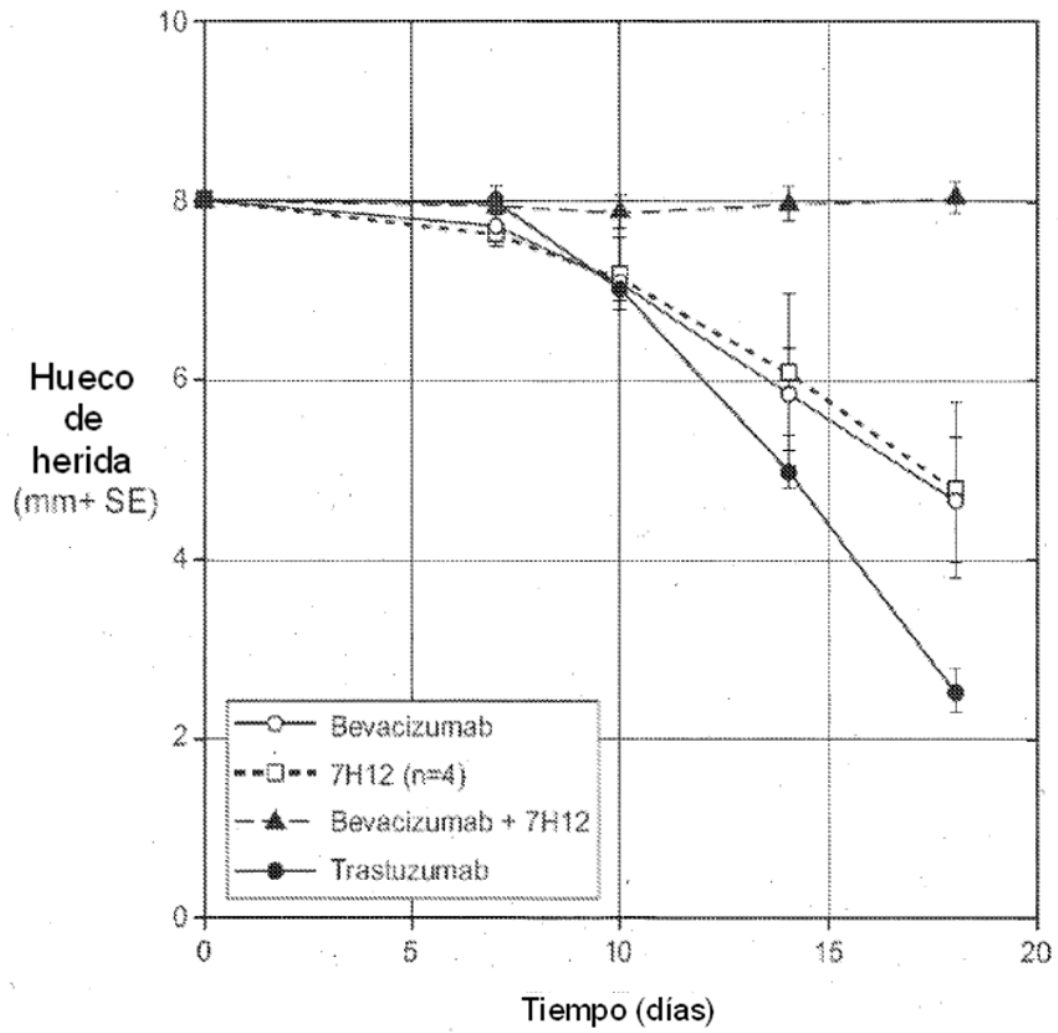


FIG. 10

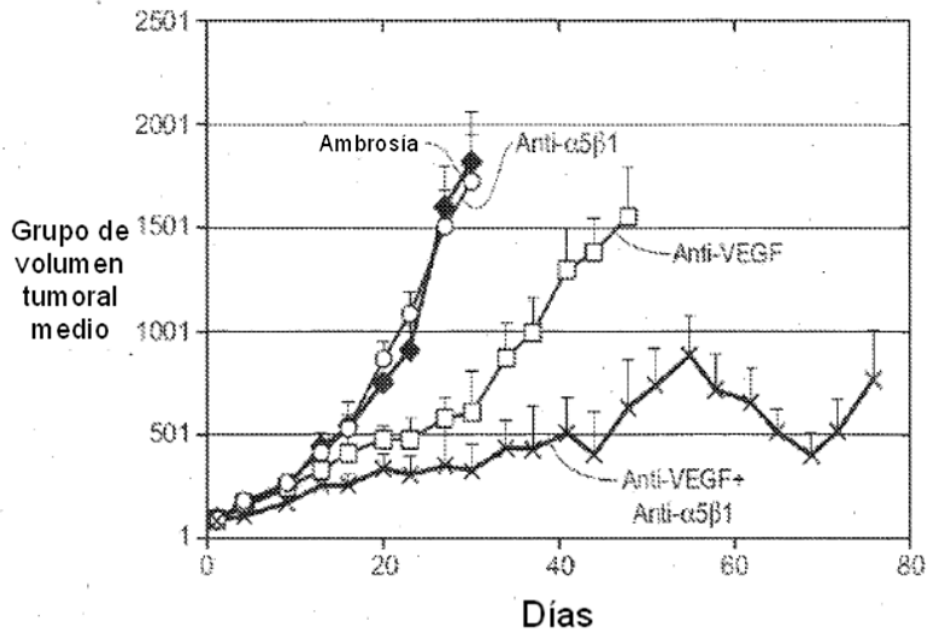


FIG. 11A

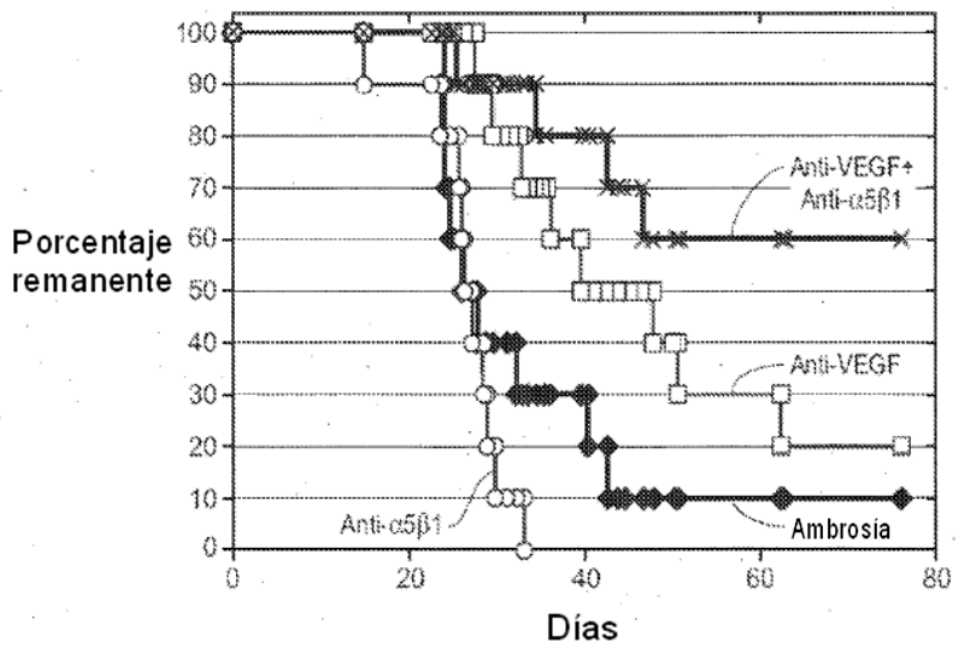


FIG. 11B

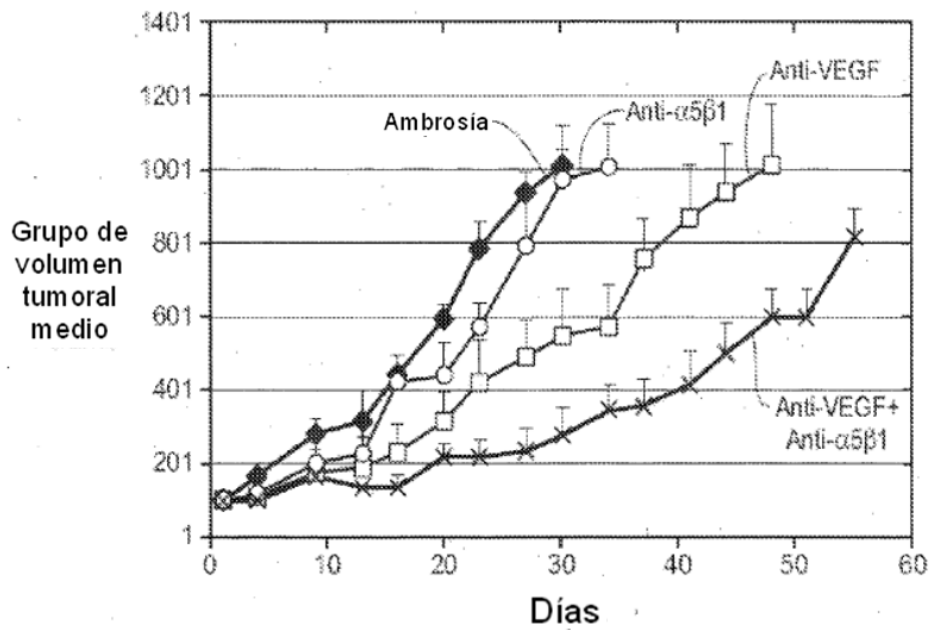


FIG. 12A

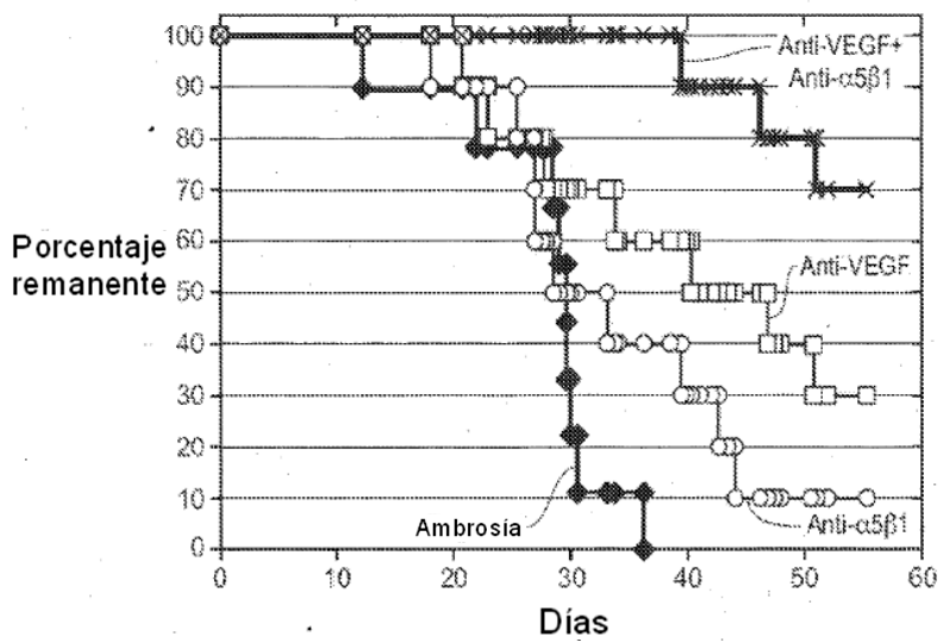


FIG. 12B

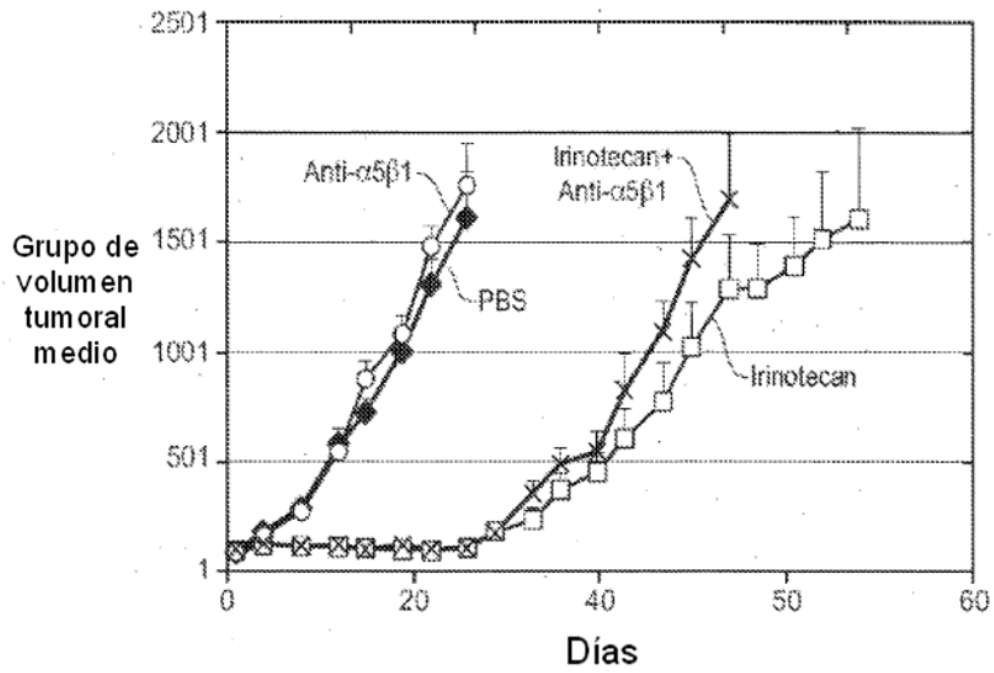


FIG. 13A

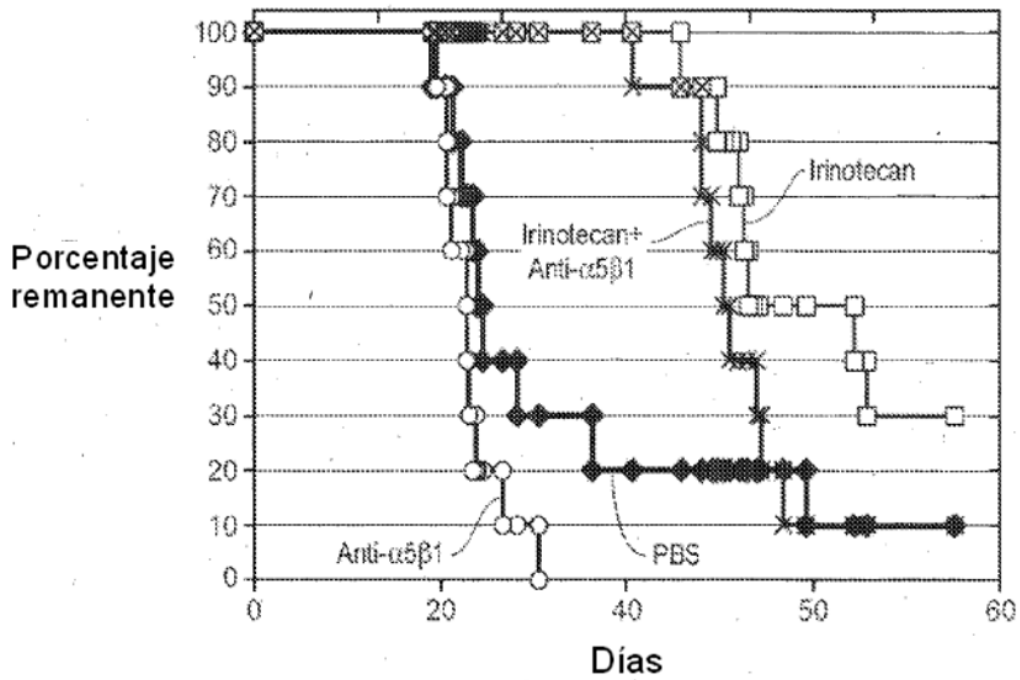


FIG. 13B

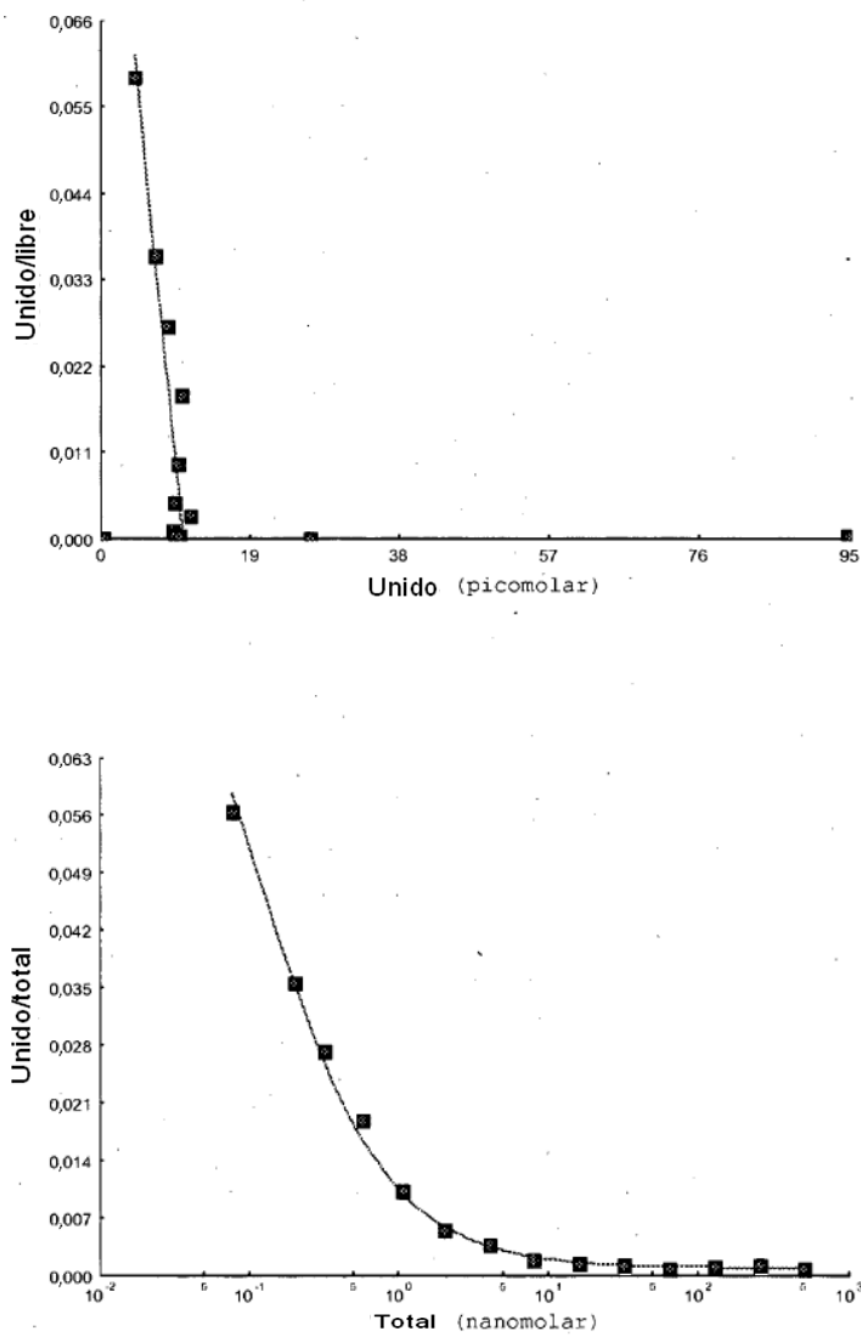


FIG. 14

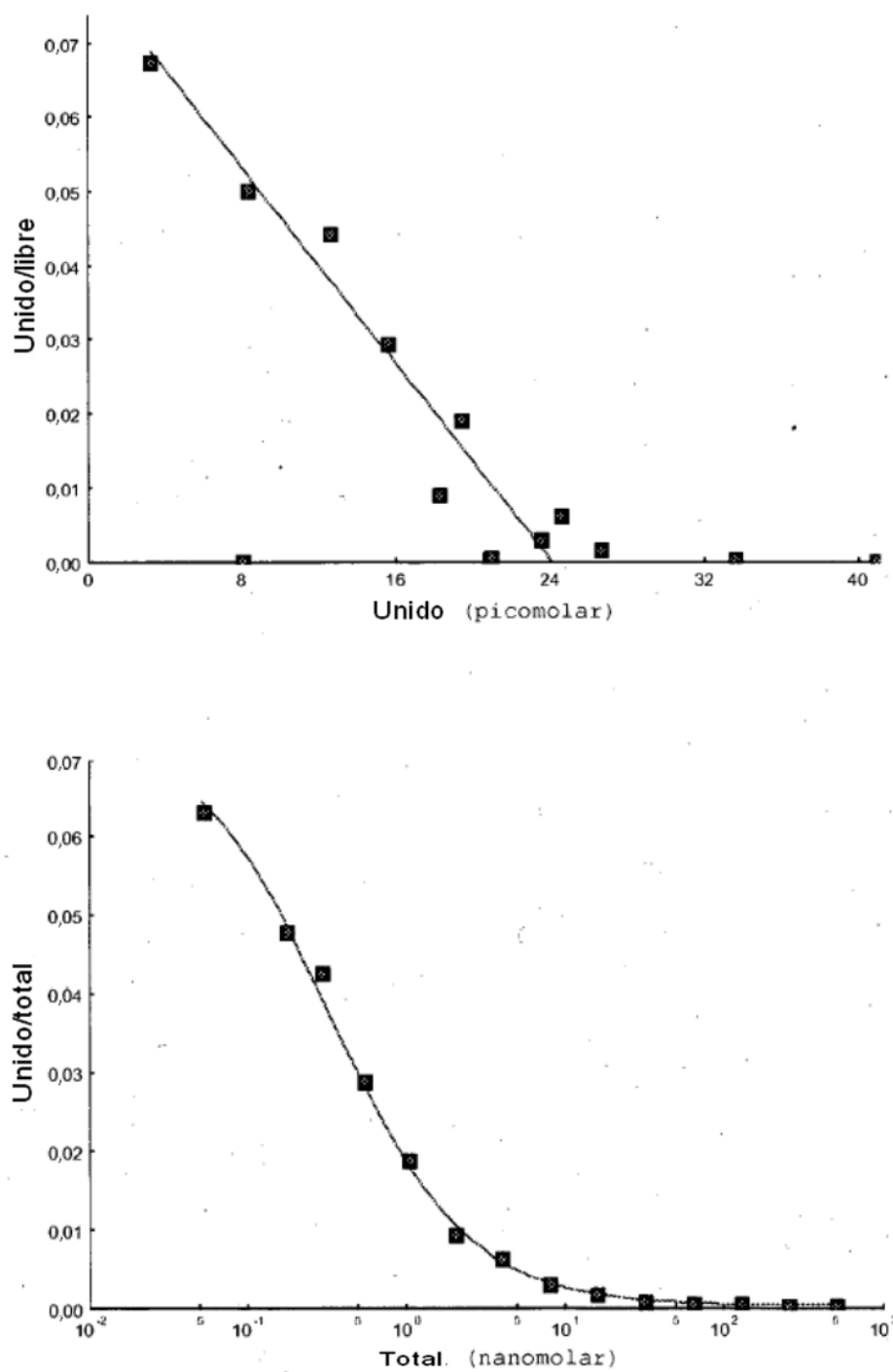


FIG. 15

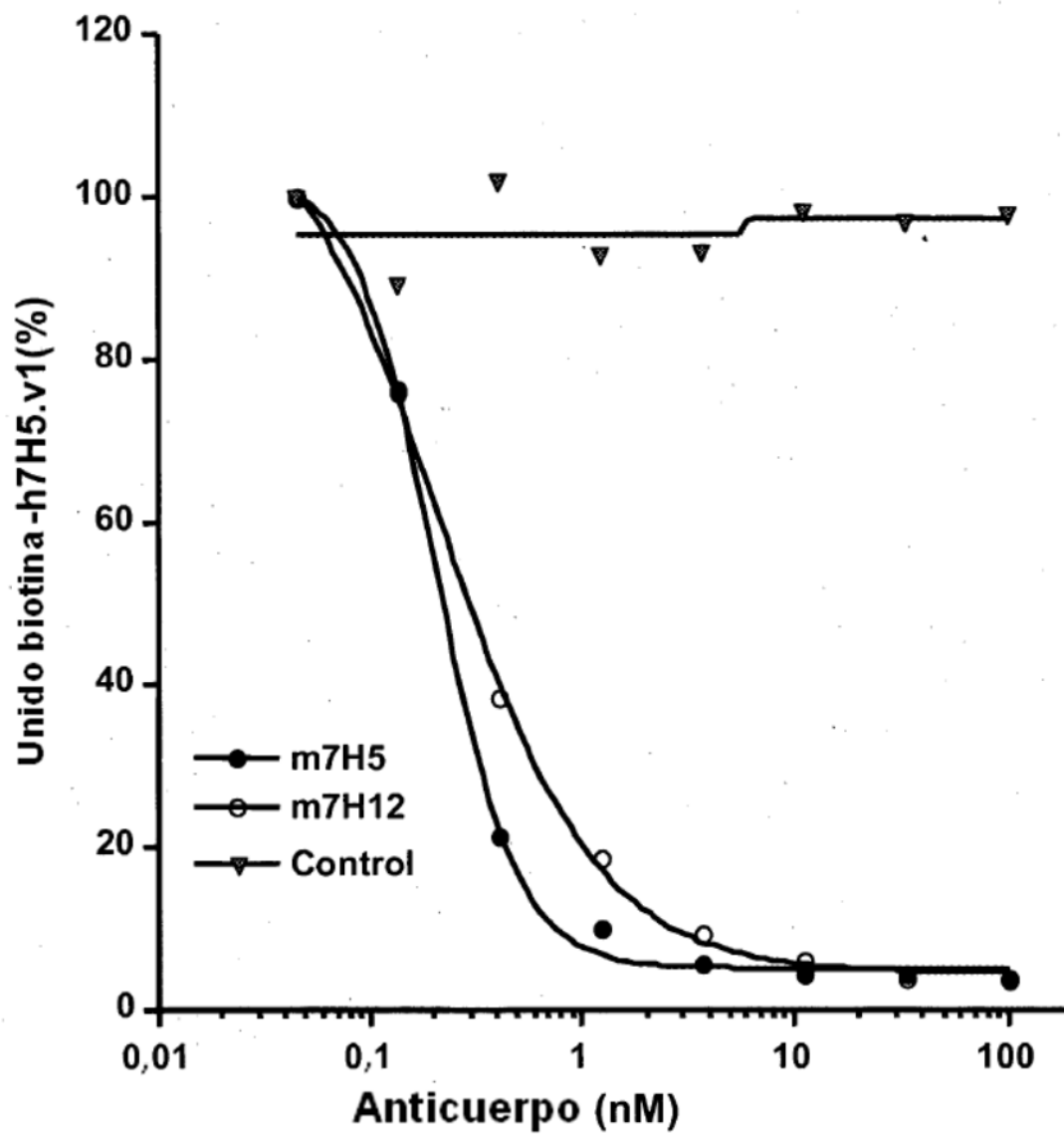


FIG. 16