

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 812**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2008 E 08846507 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2217261**

54 Título: **Composiciones de antagonistas de quinasa 1 de tipo receptor de activina y métodos de uso**

30 Prioridad:

09.11.2007 US 986876 P
19.09.2008 US 98557 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

YAN, MINHONG y
ZHANG, GU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 554 812 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

Composiciones de antagonistas de quinasa 1 de tipo receptor de activina y métodos de uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones relacionados con el uso de antagonistas de quinasa 1 de tipo receptor de activina (ALK-1, *activin receptor-like kinase 1*) para el tratamiento de trastornos asociados con la linfoangiogénesis.

10 Antecedentes de la invención

El desarrollo de un aporte vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos que crecen activamente, tales como embriones y tumores, requieren un aporte sanguíneo adecuado. Estos tejidos satisfacen esta necesidad produciendo factores proangiogénicos, que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso denominado angiogénesis. La formación de tubos vasculares es un suceso biológico complejo pero organizado que implica todas o muchas de las siguientes etapas: a) las células endoteliales (CE) proliferan a partir de CE existentes o se diferencian a partir de células progenitoras; b) las CE migran y coalescen para formar estructuras similares a cuerdas; c) después, las cuerdas vasculares experimentan tubulogénesis para formar vasos con un lumen central; d) las cuerdas o los vasos existentes producen brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelación y reformación posterior; y f) se reclutan células peri-endoteliales que revisten los tubos endoteliales, proporcionando funciones de mantenimiento y moduladoras a los vasos; incluyendo dichas células pericitos en capilares pequeños, células de la musculatura lisa en vasos más grandes y células miocárdicas en el corazón. Hanahan, D. *Science* 277: 48-50 (1997); Hogan, B. L. y Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3: 513-23 (2002); Lubarsky, B. y Krasnow, M. A. *Cell*. 112: 19-28(2003).

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

En el caso del crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia y para proporcionar alimento para el crecimiento y metástasis del tumor. Folkman *et al.*, *Nature* 339: 58 (1989). La neovascularización permite a las células tumorales adquirir una ventaja de crecimiento y una autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Normalmente un tumor comienza como una sola célula aberrante que puede proliferar solo a un tamaño de algunos milímetros cúbicos debido a la distancia de lechos capilares disponibles y puede permanecer 'latente' sin crecimiento ni diseminación posterior durante un largo periodo de tiempo. Después algunas células tumorales cambian al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran dentro de nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recién formados no solo permiten el crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de las células tumorales metastásicas. Por consiguiente, en el cáncer de mama, así como en diversos otros tumores, se ha observado una correlación entre la densidad de los microvasos en secciones tumorales y la supervivencia de los pacientes. Weidner *et al.*, *N. Engl. J. Med* 324: 1-6 (1991); Horak *et al.*, *Lancet* 340: 1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, *Lancet* 340: 145-146 (1992). El mecanismo exacto que controla el cambio angiogénico no se conoce bien, pero se piensa que la neovascularización de la masa tumoral da como resultado el equilibrio neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman *Nat Med* 1(1): 27-31 (1995)).

El documento WO 2007/040912 describe anticuerpos contra ALK-1 que pueden inhibir la angiogénesis de vasos sanguíneos y sus usos terapéuticos.

Normalmente se acepta que la metástasis es responsable de la inmensa mayoría, estimada al 90 %, de las muertes por tumores sólidos (Gupta y Massague, *Cell* 127, 679-695 (2006)). El complejo proceso de la metástasis implica una serie de etapas distintas que incluyen la separación de las células tumorales del tumor primario, la intravasación de las células tumorales al interior de los vasos linfáticos o sanguíneos y la extravasación y el crecimiento de las células tumorales en sitios secundarios. El análisis de ganglios linfáticos regionales en muchos tipos de tumor sugiere que la vasculatura linfática es una vía importante para la diseminación de cánceres humanos. Además, en casi todos los carcinomas, la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos es el factor de pronóstico adverso más importante. Aunque anteriormente se pensaba que dicha metástasis estaba exclusivamente implicada en el paso de células malignas a lo largo de vasos linfáticos preexistentes cerca de tumores, recientes estudios experimentales e informes clínicopatológicos (revisados en Achen *et al.*, *Br J Cancer* 94 (2006), 1355-1360 y Nathanson, *Cancer* 98,413-423 (2003)) sugieren que los tumores sólidos pueden inducir la linfoangiogénesis y promover la propagación del tumor. Estos y otros recientes estudios sugieren que el tratamiento dirigido del sistema

linfático y de la linfoangiogénesis puede ser una estrategia terapéutica útil para limitar el desarrollo de la metástasis del cáncer, que lo supondría un beneficio significativo para muchos pacientes.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los agentes que modulan la ruta de la quinasa 1 de tipo receptor de activina (ALK-1) pueden alterar la linfoangiogénesis. El tratamiento con un antagonista de ALK-1 produce un brote potenciado de células endoteliales, pericitos desorganizados y un desarrollo vascular inadecuado que incluye vasculatura tumoral y linfática. Los modelos tumorales tratados con un antagonista de ALK-1 producen la inhibición del crecimiento del tumor en diversos tipos de cáncer. Por consiguiente, la invención proporciona antagonistas y composiciones para inhibir la linfoangiogénesis, para su uso en el tratamiento dirigido de afecciones patológicas asociadas con la misma como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de ALK-1 para su uso en un método de inhibición de la linfoangiogénesis, que comprende administrar a un sujeto que necesite la inhibición de la linfoangiogénesis, una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual se inhibe la linfoangiogénesis como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones el sujeto padece, por ejemplo, un tumor, un cáncer, un trastorno celular proliferativo, degeneración macular, una enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética o soriasis. En algunas realizaciones el tumor, el cáncer o el trastorno proliferativo es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

En otro aspecto, la invención proporciona un antagonista de ALK-1 para su uso en un método para el tratamiento de una afección patológica asociada con linfoangiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual se trata la afección patológica asociada con la linfoangiogénesis, como se define en las reivindicaciones. La afección patológica asociada con la linfoangiogénesis puede ser, por ejemplo, un tumor, un cáncer, un trastorno celular proliferativo, degeneración macular, enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética o soriasis. En algunas realizaciones, el tumor, el cáncer o el trastorno celular proliferativo es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

La invención también proporciona el uso de un antagonista de ALK-1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una afección patológica asociada con la linfoangiogénesis como se define en las reivindicaciones. Dichas afecciones incluyen, por ejemplo, un tumor, un cáncer, un trastorno celular proliferativo, degeneración macular, una enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética o soriasis. También se proporciona el uso de un antagonista de ALK-1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de metástasis tumoral.

En un aspecto adicional la invención se refiere a un método de inhibición de la linfoangiogénesis tumoral en un sujeto que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual se inhibe la linfoangiogénesis tumoral. La invención también se refiere a un método de inhibición o prevención de metástasis tumoral en un sujeto que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual se inhibe o previene la metástasis tumoral. En algunas realizaciones, el sujeto ha desarrollado o corre el riesgo de desarrollar metástasis tumoral. La metástasis tumoral puede estar, por ejemplo, en el sistema linfático, o en un órgano distante.

En el presente documento también se describe un método para alterar en un sujeto la organización de los pericitos, que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual la organización de los pericitos se altera. El sujeto puede padecer, por ejemplo, un tumor, un cáncer, un trastorno celular proliferativo, degeneración macular, enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética o soriasis. El tumor, el cáncer o el trastorno celular proliferativo puede ser carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

En otro aspecto más, la invención proporciona un antagonista de ALK-1 para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual el crecimiento tumoral se inhibe como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona un antagonista de ALK-1 para su uso en un método para el tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno celular proliferativo en un sujeto que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, mediante lo cual el tumor, el cáncer o el trastorno celular proliferativo se trata como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el tumor, el cáncer, o el trastorno celular proliferativo es, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

En algunas realizaciones de los usos médicos de la invención, los métodos comprenden adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénesis. En algunas realizaciones, el agente antiangiogénesis es un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), por ejemplo, un anticuerpo anti VEGF. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab. En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente administrar uno o más agentes quimioterapéuticos.

En el presente documento también se describe un método para potenciar la eficacia de un agente antiangiogénesis en un sujeto que tiene una afección patológica asociada con la angiogénesis, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 en combinación con el agente antiangiogénesis, mediante lo cual se potencia dicha actividad inhibidora del agente antiangiogénesis. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con la angiogénesis es un tumor, un cáncer o un trastorno celular proliferativo.

El antagonista de ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1, que comprende los restos de aminoácidos 22-352 de SEC ID N°: 2, los restos de aminoácidos 22-349 de SEC ID N°: 4, los restos de aminoácidos 22-347 de SEC ID N°: 6, los restos de aminoácidos 22-350 de SEC ID N°: 8 o los restos de aminoácidos 22-350 de SEC ID N°: 10.

También se proporcionan antagonistas de ALK-1 para su uso en la prevención, inhibición o el tratamiento de metástasis tumoral o el tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno celular proliferativo. El antagonista de ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1. La inmunoadhesina de ALK-1 comprende los restos de aminoácidos 22-352 de SEC ID N°: 2, los restos de aminoácidos 22-349 de SEC ID N°: 4, los restos de aminoácidos 22-347 de SEC ID N°: 6, los restos de aminoácidos 22-350 de SEC ID N°: 8 o los restos de aminoácidos 22-350 de SEC ID N°: 10. La invención también proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno celular proliferativo que comprende una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El antagonista de ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1 que comprende los restos de aminoácidos 22-352 de SEC ID N°: 2, los restos de aminoácidos 22-349 de SEC ID N°: 4, los restos de aminoácidos 22-347 de SEC ID N°: 6, los restos de aminoácidos 22-350 de SEC ID N°: 8 o los restos de aminoácidos 22-350 de SEC ID N°: 10.

En el presente documento también se describe un artículo de fabricación que comprende un envase y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un antagonista de ALK-1. En el presente documento también se describe un kit que comprende un antagonista de ALK-1 e instrucciones para usar el antagonista de ALK-1. También se describe un método para preparar una composición que comprende mezclar una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de ALK-1 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B son imágenes de microscopia de contraste de fases tomadas el día 9 de ensayos de formación de brotes de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en geles de fibrina 3-D en ausencia (Figura 1A) o en presencia (Figura 1B) de ALK1.Fc (5 µg/ml).

Las Figuras 2A-2F son imágenes confocales de retinas de rata extraídas el día 11 postnatal, P11 y teñidas con anti CD31 y FITC Lectina. Ratas neonatales recibieron una inyección i.p. de ALK1.Fc o de PBS 10 mg/kg el día 4 postnatal (P4), P6 y P9.

Las Figuras 3A-3F son imágenes confocales de retinas de rata extraídas el día P11 y teñidas con anticuerpo anti-alfa actina de musculo liso (ASMA, *anti-alpha smooth muscle actin*) conjugado con Cy3 y Lectina-FITC. A ratas neonatales se les inyectaron i.p. 10 mg/kg de ALK1.Fc o de PBS 10 mg/kg el día P4, P6 y P9.

Las Figuras 4A-4F son imágenes confocales de retinas de rata extraídas el día P11 y teñidas con anticuerpo anti-alfa actina de musculo liso (ASMA) conjugado con Cy3 y Lectina-FITC. Ratas neonatales recibieron una inyección i.p. de ALK1.Fc o PBS 10 mg/kg el día P4, P6 y P9.

Las Figuras 5A-5B son gráficos que muestran que ALK1.Fc (10 mg/kg) inhibe el crecimiento tumoral en xenoinjertos de HM7 (Figura 5A) y MV522 (Figura 5B). Se muestran los volúmenes tumorales medios y las DT.

Las Figuras 6A-6B son gráficos que muestran que ALK1.Fc (10 mg/kg) inhibe el crecimiento tumoral en xenoinjertos de C6 (Figura 6A) y Calu6 (Figura 6B). Se muestran los volúmenes tumorales medios y las DT.

La Figura 7 es un gráfico que muestra que ALK1.Fc tiene actividad antitumoral aditiva cuando se combina con anti VEGF en xenoinjertos de HM7.

La Figura 8 es un gráfico que muestra que ALK1.Fc tiene actividad antitumoral aditiva cuando se combina con anti-VEGF en xenoinjertos de LL2.

Las Figuras 9A-9D son imágenes confocales que muestran la densidad vascular tumoral en ratones de modelo de tumor LL2 tratados con PBS (Figura 9A), ALK1.Fc (Figura 9B), anticuerpo anti VEGF (B20-4.1, 5 mg/kg) (Figura 9C) o anticuerpo anti VEGF y ALK1.Fc (Figura 9D).

Las Figuras 10A-10B son imágenes confocales de vellosidades intestinales de ratones neonatales tratados con PBS (Figura 10A) o con ALK1.Fc (Figura 10B). Los tejidos se tiñeron con anti CD31 para mostrar los vasos sanguíneos capilares y con anti LYVE-1 para mostrar los capilares linfáticos.

Las Figuras 11A-11B son imágenes confocales de una sola vellosidad intestinal de ratones neonatales tratados con PBS (Figura 11A) o con ALK1.Fc (Figura 11B). Los tejidos se tiñeron con anti CD31 para mostrar los vasos sanguíneos capilares y con anti LYVE-1 para mostrar los capilares linfáticos.

Las Figuras 12A-12F son imágenes confocales de piel de cola de ratón de ratones neonatales tratados con PBS (Figuras 12A-C) o con ALK1.Fc (Figuras 12D-F). Los tejidos se tiñeron con anti CD31 para mostrar los vasos sanguíneos capilares y con anti LYVE-1 para mostrar los capilares linfáticos.

Las Figuras 13A-B son imágenes confocales que muestran la organización de los pericitos en ratones de modelo tumoral TIB68 tratados con PBS (Figura 13A) o con ALK1.Fc (Figura 13B)

La Figura 14 muestra imágenes confocales de retinas de ratón extraídas el día P8 y teñidas con anti CD31. Los ratones recibieron una inyección i.p. de PBS, ALK1.Fc, ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 o ALK1.Fc.5 los días P4 y P6.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, incluidas en la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía, tal como en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994).

A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, N. Y. 1994) y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4ª ed., John Wiley & Sons (Nueva York, N. Y. 1992), proporcionan a un experto en la técnica una orientación general de muchos de los términos usados en la presente solicitud.

Definiciones

El término "ALK-1" (denominado indistintamente "quinasa 1 de tipo receptor de activina"), de la manera en la que se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente otra cosa, a cualquier polipéptido de ALK-1 nativo o variante (nativa o sintética). La expresión "secuencia nativa" incluye específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas alternativas de corte y empalme) y variantes alélicas de origen natural. La expresión "ALK-1 de tipo silvestre" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína ALK-1 de origen natural. La expresión "secuencia de ALK-1 de tipo silvestre" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en una ALK-1 de origen natural.

Una molécula "ALK-1 quimérica" es un polipéptido que comprende una ALK-1 de longitud completa o uno o más dominios del mismo fusionados o unidos a un polipéptido heterólogo. La molécula ALK-1 quimérica generalmente compartirá al menos una propiedad biológica en común con la molécula ALK-1 de origen natural. Un ejemplo de una molécula ALK-1 quimérica es una que es un epítipo etiquetado con fines de purificación. Otra molécula ALK-1 quimérica es una inmunoadhesina de ALK-1.

De la manera en la que se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de una inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de unión y reconocimiento del antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina es normalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

La expresión "inmunoadhesina de ALK-1" se usa indistintamente con la expresión "quimera de inmunoglobulina de ALK-1" y se refiere a una molécula quimérica que combina al menos una parte de una molécula de ALK-1 (nativa o variante) con una secuencia de inmunoglobulina. En algunos casos, la inmunoadhesina de ALK-1 que comprende el dominio extracelular (DEC) de ALK-1 o una parte del mismo, es suficiente para unirse a un ligando de ALK-1. En algunas realizaciones, el extremo N de la parte ALK-1 de la inmunoadhesina de ALK-1 puede comenzar en cualquier resto de aminoácido de Asp 22 a Ser 27 (inclusive) de SEC ID N°: 2 y el extremo C de la parte ALK-1 de la inmunoadhesina de ALK-1 puede terminar en cualquier resto de aminoácido de Ser 110 a Glu 118 de SEC ID N°: 2 (inclusive). En algunas realizaciones, la inmunoadhesina de ALK-1 comprende los restos de aminoácidos 1-118 de SEC ID N°: 2. En algunas realizaciones, la inmunoadhesina ALK-1 comprende los restos de aminoácidos 22-118 de SEC ID N°: 2, los restos 23-118 de SEC ID N°: 2, los restos 24-118 de SEC ID N°: 2, los restos 25-118 de SEC ID N°: 2, los restos 26-118 de SEC ID N°: 2, o los restos 27-118 de SEC ID N°: 2. En algunas realizaciones la inmunoadhesina ALK-1 no procesada es ALK1.Fc (SEC ID N°: 2), ALK1.Fc.2 (SEC ID N°: 4), ALK1.Fc.3 (SEC ID N°: 6), ALK1.Fc.4 (SEC ID N°: 8) o ALK1.Fc.5 (SEC ID N°: 10). En algunas realizaciones, la inmunoadhesina de ALK-1 comprende los restos de aminoácidos 22-352 de SEC ID N°: 2, los restos 22-349 de SEC ID N°: 4, los restos 22-347 de SEC ID N°: 6, los restos 22-350 de SEC ID N°: 8 o los restos 22-350 de SEC ID N°: 10. Preferentemente, aunque no necesariamente, la secuencia de inmunoglobulina es un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las propiedades biológicas bioquímicas y químicas valiosas de los anticuerpos humanos. Dado que las inmunoadhesinas pueden construirse a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada, relacionada con una secuencia de dominio constante (Fc) y bisagra de inmunoglobulina humana apropiada, puede obtenerse una especificidad de unión de interés usando componentes completamente humanos. Dichas inmunoadhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente y son

inocuas para el uso prolongado o repetido. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc variante. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc funcional. La parte ALK-1 y la parte de secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina de ALK-1 pueden estar unidas mediante un enlazador mínimo.

Los ejemplos de inmunoadhesinas homomultiméricas que se han descrito para el uso terapéutico incluyen la inmunoadhesina CD4-IgG para bloquear la unión del VIH con CD4 en la superficie celular. Los datos obtenidos de ensayos clínicos de Fase I, en los que se administró CD4-IgG a embarazadas justo antes del parto, sugieren que esta inmunoadhesina puede ser útil en la prevención de la transferencia feto-materna del VIH (Ashkenazi *et al.*, Intern. Rev. Immunol. 10: 219-227 (1993)). También se ha desarrollado una inmunoadhesina que se une al factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*). El TNF es una citocina proinflamatoria que se ha observado que es un mediador principal del choque septicémico. Basándose en un molde murino de choque septicémico, una inmunoadhesina del receptor de TNF ha mostrado ser prometedora como un candidato para el uso clínico en el tratamiento de choque septicémico (Ashkenazi, A. *et al.* PNAS USA 88: 10535-10539 (1991)). ENBREL® (etanercept), una inmunoadhesina que comprende una secuencia del receptor de TNF fusionada a una región Fc de la IgG, fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos el 2 de noviembre de 1998, para el tratamiento de la artritis reumatoide. El nuevo uso expandido de ENBREL® en el tratamiento de la artritis reumatoide fue aprobado por la FDA el 6 de junio de 2000. Para una información reciente sobre bloqueadores de TNF, incluyendo ENBREL®, véase Lovell *et al.*, N. Engl. J. Med. 342: 763-169 (2000) y la editorial adjunta en las páginas 810-811; y Weinblatt *et al.*, N. Engl. J. Med. 340: 253-259 (1999); revisado en Maini y Taylor, Annu. Rev. Med. 51: 207-229 (2000).

Si los dos brazos de la estructura de la inmunoadhesina tienen diferentes especificidades, la inmunoadhesina se denomina "inmunoadhesina biespecífica" por analogía a los anticuerpos biespecíficos. Dietsch *et al.*, J. Immunol. Methods 162: 123 (1993) describen dichas inmunoadhesinas biespecíficas combinando los dominios extracelulares de las moléculas de adhesión, E-selectina y P-selectina, expresándose cada una de estas selectinas en un tipo de célula diferente en la naturaleza. Estudios de unión indican que la proteína de fusión de inmunoglobulina biespecífica formada de esta manera tenía una capacidad potenciada para unirse con una línea celular mieloide en comparación con las inmunoadhesinas monoespecíficas de las que procede.

El término "heteroadhesina" se usa indistintamente con la expresión "adhesina heteromultimérica quimérica" y se refiere a un complejo de moléculas quiméricas (secuencias de aminoácidos) en las que cada molécula quimérica combina una parte biológicamente activa, tal como el dominio extracelular de cada uno de los monómeros receptores heteromultiméricos, con un dominio de multimerización. El "dominio de multimerización" promueve la interacción estable de las moléculas quiméricas dentro del complejo heteromultimérico. Los dominios de multimerización pueden interactuar mediante una secuencia de inmunoglobulina, una cremallera de leucina, una región hidrófoba, una región hidrófila o un tiol libre que forma un enlace disulfuro intermolecular entre las moléculas quiméricas del heteromultímero quimérico. El dominio de multimerización puede comprender una región constante de inmunoglobulina. Además, por ingeniería genética puede modificarse la región de multimerización, de tal manera que las interacciones estéricas no solo promueven la interacción estable, sino que además promueven la formación de heterodímeros sobre homodímeros a partir de una mezcla de monómeros. Se han construido "protuberancias" reemplazando cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más largas (por ejemplo tirosina o triptófano). Opcionalmente, se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácidos por unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Preferentemente, pero no necesariamente, la secuencia de inmunoglobulina, es un dominio constante de inmunoglobulina. La fracción de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención puede obtenerse a partir de los subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferentemente IgG₁ o IgG₃.

En el presente documento, la expresión "región Fc" se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana se define normalmente desde el tramo un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta su extremo carboxilo. La lisina C terminal (resto 447 según el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante modificación por ingeniería genética recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 sin retirar y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

A menos que se indique otra cosa, en el presente documento, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice de EU, como indican Kabat *et al.*, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo de IgG1 humana de EU.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones

efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; RCB), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos como se desvela, por ejemplo, en el presente documento.

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

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo y puede incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a un porcentaje mayor del 95 % en peso del anticuerpo, determinado por el método de Lowry, y más preferentemente mayor del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos interna o N terminal mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, dado que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación,

Los términos "anticuerpo" y "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más general e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpo (como se describe con mayor detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, puede estar humanizado y/o madurado por afinidad.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables se diferencian bastante en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye homogéneamente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Dicha variabilidad se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por *Complementary Determining Regions*) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR, por *framework*). Los dominios variables de cada una de las cadenas nativas, pesada y ligera, comprende cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres CDR, que forma bucles que conectan, y en algunos casos formando parte de, la estructura de lámina β . En cada cadena, las CDR se sujetan entre sí en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no intervienen directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y que incluso puede entrecruzarse con el antígeno.

El fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión al antígeno completo. En una especie Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada, en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv monocatenaria, un

dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada puede unirse covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de tal manera que las cadenas pesada y ligera pueden asociarse en una estructura “dimérica” análoga a la de una especie Fv monocatenaria. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interacciona para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En su conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión antigénica al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja en comparación con la del sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena ligera. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es el nombre que recibe el fragmento Fab' en el presente documento, en el que uno o más restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden solo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte conserva preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y por tanto conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno ligado a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

Cuando en el presente documento se usa la expresión “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que es hipervariable en la secuencia y/o forma bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). En el presente documento se usan y se incluyen diversas definiciones de la región hipervariable. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En cambio Chothia se refiere a la localización de bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de los anticuerpos monoclonales (AcM) representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AcM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de “contacto” se basan en un análisis disponible de estructuras cristalinas complejas. A continuación se indican los restos de cada una de estas regiones hipervariables.

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

Las regiones hipervariables pueden comprender las siguientes “regiones hipervariables extendidas”: 24-36 o 24-34

(L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los restos de dominio variable se enumeran según Kabat *et al.*, citados anteriormente, para cada una de estas definiciones.

- 5 De la manera en la que se usa en el presente documento, los restos “marco conservados” o “FR” son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, de la manera en la que se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo (o a los mismos) epítipo (s), excepto por posibles variantes que pueden aparecer durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes generalmente presentes en menores cantidades. Dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica que se une a una diana se obtiene mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia polipeptídica de unión a diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse también, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas ya que por lo general no están contaminadas con otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar según la presente invención pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammering *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.* J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); las patentes de Estados Unidos Nº 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todos de GenPharm); 5.545.807; el documento WO 1997/17852; las patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas procedentes de inmunoglobulina no humana. En la mayoría de los casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los 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 deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales 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). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en su interior: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

- 65 Los anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) tienen una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a

una clase o subclase de anticuerpo particular, aunque el resto de la cadena, o cadenas, es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). De la manera en la que se usa en el presente documento, un anticuerpo humanizado es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

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

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto sintético o de origen natural. Preferentemente, el antígeno diana es un polipéptido.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Usando un enlazador que sea lo bastante corto como para que se permita el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios están obligados a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha fabricado usando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno que no son humanos.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más de sus CDR, que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración (o alteraciones). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la materia. Marks *et al.* Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante transposición de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de CDR y/o de restos marco conservados se describe en: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 55: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

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

"La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK, por *Natural Killer*), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citocinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Para mediar la ADCC, las células primarias, linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 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, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337 o en la Patente de Estados Unidos Nº 6.737.056 de Presta. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por *peripheral blood mononuclear cell*) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como se desvela en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Como ejemplos de

leucocitos humanos que median ADCC se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

5 Un “receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren
10 principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM, por *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, por *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) en su dominio citoplasmático (véase una revisión en M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991);
15 Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y en de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995) se revisan estos FcR. Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se incluyen dentro del término “FcR” del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas.

20 El documento WO 00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida al FcR. El contenido de esta publicación de patente se incorpora específicamente en el presente documento por referencia. Véase también, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

25 Se conocen métodos para medir la unión al FcRn (véase, por ejemplo Ghetie 1997, Hinton 2004). Puede ensayarse la unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad al FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o en líneas de células humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos variantes de Fc.

30 La “citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

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

40 La expresión “polipéptido que comprende una región Fc” se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina C terminal (resto 447 según el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante modificación recombinante por ingeniería genética del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender
45 polipéptidos con restos K447, con todos los restos K447 retirados, o con una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o
50 completamente la actividad biológica del antígeno.

Una administración “crónica” se refiere a una administración de uno o más agentes en un modo continuo a diferencia de en un modo intenso, para mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “intermitente” es un tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción,
55 sino que es, por naturaleza, cíclico.

Un “trastorno” o “enfermedad” es cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye enfermedades o trastornos agudos y crónicos, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Como ejemplos no limitantes
60 de trastornos a tratar en el presente documento se incluyen tumores malignos y benignos, carcinoma, blastoma y sarcoma. Las afecciones asociadas con linfoangiogénesis anómala o excesiva incluyen, sin limitación, tumores, cáncer, trastornos proliferativos celulares, degeneración macular, enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética y soriasis.

65 Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están

asociados con algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

“Tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, bien malignas o benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso”, la expresión “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor”, no son 3rd spacing of fluid diseases mutuamente exclusivas, tal y como se hace referencia a estos en el presente documento.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento/proliferación celular mal regulado. Como ejemplos de cáncer se incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Como ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluye cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. La mala regulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratarse mediante las composiciones y métodos de la presente invención. Estos trastornos incluyen afecciones tanto neoplásicas como no neoplásicas. Los trastornos neoplásicos incluyen, pero sin limitación, los descritos anteriormente.

Los trastornos no neoplásicos incluyen, pero sin limitación, hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), soriasis, placas soriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatía diabética u otras retinopatías proliferativas incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización de injerto de córnea, rechazo de injerto de córnea, neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea u otro tejido, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/ARDS (síndrome de distrés respiratorio agudo), septicemia, hipertensión pulmonar primaria, derrame pulmonar maligno, edema cerebral (por ejemplo asociado a ictus agudo/lesión/traumatismo cerrado de cabeza), inflamación sinovial, formación de *pannus* en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad del ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades intersticiales del 3er espacio (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), miomas uterinos, parto prematuro, inflamación crónica, tal como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento masivo de tejido no deseado o aberrante (no canceroso), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome de Osler-Weber, glaucoma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como el asociado a pericarditis) y derrame pleural.

De la manera en la que se usa en el presente documento, un “tratamiento” se refiere a una intervención clínica en un intento de modificar el ciclo natural del individuo o de la célula que se esté tratando y puede realizarse bien por profilaxis o durante el transcurso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o recurrencia de enfermedades, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Un “sujeto” es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas y ovejas), animales para el deporte, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

Para los fines de un tratamiento un “mamífero” se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos, de granja y zoológico, animales para el deporte o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula puede variar según factores tales como la patología, la edad, el sexo y peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista, está compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes que, o en una fase

temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión “agente citotóxico” de la manera en la que se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa su destrucción. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, J¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, R¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus tratamientos tales como enzimas nucleolíticas, anticuerpos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o sus variantes y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos desvelados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacina; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1 y caliqueamicina omega1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMICIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona epitostanol, mepitiostane, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico, tales como ácido frolinico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguanina; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINA®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Miers Squibb Oncologi, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ formulación de la paclitaxel con nanopartículas diseñadas con albúmina si Cremophor (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antoni, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINA®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitaina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan regulando, reduciendo, bloqueando o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y están a menudo en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser hormonas en sí mismas. Como ejemplos se incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno

(incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® toremifeno; antiprogesteronas; reguladores negativos de receptores de estrógenos (ERD); agentes que actúan suprimiendo o inactivando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona reguladora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como LUPRON® y ELIGARD® acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben a la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX® anastrozol. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® y OSTAC®), DIDROCAL® etidronato, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato o ACTONEL® risedronato; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido de la citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa doble de EGFR y ErbB-2 también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos anteriores.

Quando en el presente documento se usa la expresión “agente inhibidor del crecimiento”, se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de las células (tales como células que expresan ALK-1) en fase S. Como ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de las fases G1 y M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la fase G1 también extienden 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. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” de Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos contra el cáncer ambos obtenidos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), se obtiene del tejo europeo y es un análogos semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos impidiendo la despolimerización, lo que produce la inhibición de la mitosis en las células.

La “patología” de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Para el cáncer, esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anómalo o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células adyacentes, liberación de citocinas y de otros productos secretorios a niveles anómalos, supresión o empeoramiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

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

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

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para administrar a un mamífero un fármaco (tal como un polipéptido ALK-1 o un anticuerpo con el mismo). Los componentes del liposoma normalmente se disponen en una formación bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

Los términos “VEGF” y “VEGF-A” se usan indistintamente para referirse al factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos y a factores de crecimiento endotelial vascular de 121-, 145-, 183-, 189- y 206-aminoácidos, relacionados, como describen Leung *et al.* Science, 246: 1306 (1989), Houck *et al.* Mol. Endocrin., 5: 1806 (1991) y, Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5): 853-865 (2001), junto con sus formas

procesadas y alélicas de origen natural.

Un “antagonista de VEGF” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con, las actividades de VEGF incluyendo su unión a uno o más de los receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF mediante lo cual se secuestra su unión a uno o más receptores, a anticuerpos receptores anti VEGF y a antagonistas de receptores de VEG, tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas VEGFR y proteínas de fusión, por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-gelonina (Peregrine). Los antagonistas de VEGF también incluyen variantes antagonistas de VEGF, moléculas antisentido dirigidas contra VEGF, aptámeros de ARN y ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF.

Un “anticuerpo anti VEGF” es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo anti VEGF puede usarse como un agente terapéutico actuando e interfiriendo sobre enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de VEGF. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.703.020; los documentos WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202, WO2005/044853; EP 0666868B1; las solicitudes de patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004); y el documento WO2005012359. Un anticuerpo anti VEGF normalmente no se unirá a otros homólogos de VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento, tales como PIGF, PDGF o bFGF. El anticuerpo anti VEGF “Bevacizumab (BV)”, también conocido como “rhuMab VEGF” o “Avastin®”, es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (*rhuMab*) anti VEGF, generado según Presta *et al.* Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997). Este anticuerpo comprende regiones marco conservadas de IgG1 humanas mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti hVEGF murino, A.4.6.1, que bloquea la unión de VEGF humano con sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones marco conservadas, procede de la IgG1 humana y aproximadamente el 7 % de la secuencia procede del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene un peso molecular de aproximadamente 149.000 dalton y está glucosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos anti VEGF humanizados, incluyendo el fragmento de anticuerpo anti VEGF “ranibizumab”, también conocido como “Lucentis®”, se describen adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N° 6.884.879 publicada el 26 de febrero de 2005.

La expresión “actividad biológica” y “biológicamente activo” con respecto a un polipéptido ALK-1 se refiere a propiedades físicas/químicas y a funciones biológicas asociadas con ALK-1. En algunas realizaciones, la “actividad biológica” de ALK-1 incluye uno o más de: unión de ALK-1 a un ligando de ALK-1, por ejemplo, BMP9 y/o BMP10, o activación de la señalización molecular de ALK-1 aguas abajo, por ejemplo, fosforilación de Smad 1, Smad5 y/o Smad8.

Un “antagonista de ALK-1” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con, las actividades de una ALK-1 incluyendo, por ejemplo, la reducción o el bloqueo de la activación del receptor de ALK-1, la reducción o el bloqueo de la señalización molecular aguas abajo de ALK-1, por ejemplo, fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8, la alteración o el bloqueo de la unión de ligandos de ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) a ALK-1. Los antagonistas de ALK-1 incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional y traduccional y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína y proteínas de fusión (incluyendo inmunoconjugados), moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a proteínas, mediante lo cual se secuestra su unión con su diana, variantes antagonistas de la proteína, moléculas de ARN dirigidas contra una proteína, moléculas antisentido dirigidas contra una proteína, aptámeros de ARN y ribozimas contra una proteína. En algunas realizaciones, el antagonista de ALK-1 es una molécula que se une a ALK-1 y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con, una actividad biológica de ALK-1.

La expresión “composición antineoplásica” se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, un “agente contra el cáncer”. Los ejemplos de agentes terapéuticos (agentes contra el cáncer, también denominados agentes “antineoplásicos” en el presente documento) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina, toxinas y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF, un antagonista de VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), un inhibidor de HER1/EGFR, erlotinib, un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o a más de ErbB2, ErbB3, ErbB4 o a uno más receptores de VEGF, inhibidores de tirosina quinasas receptoras del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y/o del factor de células madre (SCF) (por ejemplo, mesilato de imatinib (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2L y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc.

El término “profármaco” como se usa en esta solicitud, se refiere a una forma precursora o derivada de una

sustancia farmacéuticamente activa, que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de activarse o convertirse enzimáticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, págs. 375-382, 615^a Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados de D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina, que pueden convertirse en el fármaco más activo sin efectos citotóxicos. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profarmacológica para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento de células endoteliales, la estabilidad de vasos sanguíneos; y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia de VEGF, PIGF, la familia PDGF, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos de TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ANGPTL3, ALK-1, etc. También deberían incluirse factores que aceleran la curación de heridas, tales como la hormona del crecimiento, el factor I de crecimiento insulínico (IGF-I), VIGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia y TGF- α y TGF- β . Véase, por ejemplo Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 enumera factores angiogénicos) y Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003).

Un "agente antiangiogénesis" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o ARNip)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhiben la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseable, bien directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista contra un agente angiogénico, como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF, anticuerpos contra receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización de receptores de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (sunitinib malato), AMG706, o los descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénesis también incluyen inhibidores nativos de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 enumera terapias antiangiogénicas en mieloma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2 enumera factores antiangiogénicos); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (por ejemplo la Tabla 1 enumera agentes antiangiogénesis usados en ensayos clínicos).

Métodos y composiciones de la invención

La presente divulgación se basa en parte en el descubrimiento de que los agentes que modulan la ruta de ALK-1 (por ejemplo una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti ALK-1) son capaces de afectar tanto a la angiogénesis así como a la linfangiogénesis. En un aspecto, la divulgación proporciona un método de prevención de la diferenciación de células endoteliales en un estadio más maduro de diferenciación, que comprende poner en contacto las células endoteliales con un antagonista de ALK-1. Las células endoteliales pueden ser cualquier tipo de células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales de sangre o linfáticas. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para alterar la organización de los pericitos, que comprende poner en contacto estos últimos con un antagonista de ALK-1. Además, se descubrió que dichos agentes podían inhibir el crecimiento tumoral, actuando tanto como un solo agente o en combinación con un antagonista de VEGF. Por consiguiente, los antagonistas de ALK-1 son útiles para tratar afecciones y trastornos patológicos asociados con la angiogénesis, así como con la linfangiogénesis.

Se contempla que los antagonistas de ALK-1 pueden usarse para tratar o prevenir diversas afecciones o trastornos patológicos. La divulgación se refiere a un método para inhibir la linfangiogénesis usando una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 tal como, pero sin limitación, un inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti ALK-1, para inhibir la activación de la ruta del receptor de ALK-1. En otro aspecto la divulgación se refiere a un método de inhibición de la linfangiogénesis que comprende administrar, a un sujeto que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1.

Los ejemplos de afecciones o trastornos patológicos asociados con linfangiogénesis anómala incluyen, sin limitación, tumor, cáncer, metástasis tumoral o cancerosa, trastorno proliferativo celular, degeneración macular, enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética y soriasis. En un aspecto, la invención se refiere a un método de inhibición o prevención de la linfangiogénesis tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. La invención también se refiere a un método para inhibir o prevenir la metástasis tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una

cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. En algunas realizaciones, el sujeto puede haber desarrollado, o correr el riesgo de desarrollar, metástasis tumoral. Dicha metástasis puede estar en el sistema linfático o en un órgano distante.

- 5 La divulgación proporciona un método para alterar la organización de los pericitos en un sujeto, que comprende administrar al mismo, una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. En algunas realizaciones el sujeto padece tumor, cáncer, metástasis tumoral o cancerosa, trastorno proliferativo celular, degeneración macular, enfermedad inflamatoria mediada por inmunidad, artritis reumatoide, retinopatía diabética y soriasis. En algunas realizaciones la alteración de la organización de los pericitos se produce en los vasos tumorales de un sujeto que padece
- 10 enfermedad neoplásica, tal como un tumor o cáncer.

- La invención contempla un método de tratamiento de un tumor, un cáncer, un trastorno proliferativo celular y/o trastorno neoplásico en un sujeto, que comprende administrar al mismo, una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. En un aspecto la invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que
- 15 comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. Como ejemplos de trastornos neoplásicos a tratar con un antagonista de ALK-1 se incluyen, pero sin limitación, los descritos en el presente documento con los términos "cáncer" y "canceroso".

- Las afecciones neoplásicas que pueden considerarse para el tratamiento con antagonistas de ALK-1 útiles en la invención, incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), soriasis, placas soriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, edema tras infarto de miocardio, retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas, incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización por injerto de córnea, rechazo de injerto de córnea,
- 20 neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante de tejido de córnea y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/ARDS (síndrome de distrés respiratorio agudo), septicemia, hipertensión pulmonar primaria, derrame pulmonar maligno, edema cerebral (por ejemplo asociado a ictus agudo/lesión/traumatismo cerrado de cabeza), inflamación sinovial, formación de *pannus* en AR, miositis osificante,
- 25 formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad del ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades intersticiales del 3er espacio (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), miomas uterinos, parto prematuro, inflamación crónica, tal como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento masivo de
- 30 tejido no deseado o aberrante (no canceroso), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome de Osler-Weber, glaucoma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como el asociado a pericarditis) y derrame pleural.

40 **Terapias de combinación**

- Como se indica anteriormente, la divulgación proporciona usos médicos que comprenden terapias combinadas en las que un antagonista de ALK-1 (tal como una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti ALK-1) se administra con otra terapia. Por ejemplo, para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas, se usan antagonistas de
- 45 ALK-1 en combinaciones con un agente contra el cáncer o con un agente antiangiogénesis. En otro ejemplo, se usan antagonistas de ALK-1 en combinación con agentes antilinfangiogénicos (por ejemplo, un antagonista de VEGFC tal como anticuerpo anti VEGFC). En una realización, la afección neoplásica o no neoplásica se caracteriza por un trastorno patológico asociado a angiogénesis aberrante o no deseada o con linfangiogénesis. El antagonista de ALK-1 puede administrarse en serie o en combinación con otro agente que sea efectivo para esos fines, bien en
- 50 la misma composición o en composiciones distintas. Como alternativa, o adicionalmente, pueden administrarse inhibidores múltiples de ALK-1.

- La administración del antagonista de ALK-1 y el otro agente terapéutico (por ejemplo, un agente contra el cáncer, un agente antiangiogénesis) puede llevarse a cabo simultáneamente, por ejemplo, como una sola composición o como
- 55 dos o más composiciones distintas, usando las mismas vías de administración o diferentes. Como alternativa, o adicionalmente, la administración puede realizarse secuencialmente en cualquier orden. Como alternativa, o adicionalmente, las etapas pueden realizarse como una combinación tanto secuencial como simultáneamente, en cualquier orden.

- En determinadas realizaciones, entre las administraciones de las dos o más composiciones, puede haber intervalos que varían de minutos a días y de semanas a meses. Por ejemplo, el agente contra el cáncer puede administrarse en primer lugar y después el antagonista de ALK-1. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del antagonista de ALK-1 primero. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un antagonista de ALK-1 (tal como una inmunoadhesina
- 60 de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1), seguido de la administración de un agente antiangiogénesis (tal como un antagonista de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF). En una realización, el agente antiangiogénesis es un
- 65

anticuerpo o fragmento neutralizante anti-VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; los documentos WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; las solicitudes de Patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004); y el documento WO2005012359.

Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos administradas en combinación con un antagonista de ALK-1, serán las que considere el médico o veterinario según su criterio. La administración y la graduación de la dosificación se realizan para conseguir el tratamiento máximo de las afecciones que vayan a tratarse. La dosis también dependerá de factores tales como el tipo de agente terapéutico que vaya a usarse y del paciente específico que vaya a tratarse. Las dosificaciones adecuadas para el agente contra el cáncer son aquellas que actualmente se usan y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente contra el cáncer y el antagonista de ALK-1. En determinadas realizaciones, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un solo inhibidor. El término "potencia" se refiere a una mejora en la eficacia de un agente terapéutico a su dosis habitual o autorizada. Véase también el apartado del presente documento titulado *Composiciones Farmacéuticas*.

Normalmente, los antagonistas de ALK-1 y los agentes contra el cáncer son idóneos para la misma enfermedad o similares para bloquear o reducir un trastorno patológico tal como un tumor, un cáncer, o un trastorno celular proliferativo. En una realización, el agente contra el cáncer es un agente antiangiogénesis.

La terapia antiangiogénica en relación con el cáncer es una estrategia de tratamiento del cáncer con objeto de inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales que son necesarios para aportar nutrientes para mantener el crecimiento tumoral. Dado que la angiogénesis está implicada tanto en el crecimiento tumoral primario como en la metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado en el presente documento puede inhibir el crecimiento neoplásico de un tumor en el sitio primario, así como prevenir la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo por tanto que otros agentes terapéuticos ataquen los tumores.

Se han identificado muchos agentes antiangiogénesis y son conocidos en la técnica, incluyendo los enumerados en el presente documento, por ejemplo, los enumerados en el apartado de *Definiciones*, y, por ejemplo, en Carmeliet y Jain, Nature 407: 249-257 (2000); Ferrara *et al.*, Nature Reviews:Drug Discovery, 3: 391-400 (2004); y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8: 200-206 (2003). Véase, también, la solicitud de patente de Estados Unidos US20030055006. En una realización, se usa un antagonista de ALK-1 en combinación con un anticuerpo (o fragmento) anti-VEGF neutralizante y/u otro antagonista de VEGF y un antagonista de un receptor de VEGF, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, un receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de bajo peso molecular de tirosina quinasas VEGFR (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF, variantes antagonistas de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, como alternativa, o de manera adicional, además del antagonista de VEGF y otro agente, al paciente se le puede administrar dos o más inhibidores de angiogénesis. En determinadas realizaciones, pueden administrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes contra el cáncer, en combinación con un antagonista de ALK-1, el antagonista VEGF y un agente antiangiogénesis.

En determinados aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral de combinación con un antagonista de ALK-1 incluyen otras terapias para el cáncer, (por ejemplo, cirugía, tratamientos radiológicos (que implican, por ejemplo, radiación o administración de sustancias radiactivas), quimioterapia, tratamiento con agentes contra el cáncer, enumerados en el presente documento y conocidos en la técnica o combinaciones de los mismos. De manera alternativa, o adicionalmente, al paciente se le puede administrar conjuntamente dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno, o a dos o más antígenos diferentes desvelados en el presente documento. A veces, también puede ser beneficioso administrar una o más citocinas al paciente.

Agentes quimioterapéuticos

En un aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno (tal como un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular) administrando cantidades eficaces de un antagonista de ALK-1 (y/o un inhibidor (o inhibidores) de angiogénesis) y uno o más agentes quimioterapéuticos. En los métodos de tratamiento combinado de la invención pueden usarse diversos agentes quimioterapéuticos. En el apartado de *"Definiciones"* del presente documento, se ofrece un listado ejemplar y no limitante de agentes quimioterapéuticos a tener en cuenta. La administración del antagonista de ALK-1 y el agente quimioterapéutico puede realizarse simultáneamente, por ejemplo, como una sola composición o como dos o más composiciones distintas, usado las mismas vías de administración o diferentes. Como alternativa, o adicionalmente, la administración puede realizarse secuencialmente, en cualquier orden. Como alternativa, o adicionalmente, las etapas pueden llevarse a cabo como una combinación tanto secuencial como simultánea, en cualquier orden. En determinadas realizaciones, entre las administraciones de las dos o más composiciones, puede haber intervalos que varían de minutos a días y de semanas a meses. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede administrarse en primer lugar y después el antagonista de ALK-1. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del antagonista de ALK-1 antes de la administración del agente quimioterapéutico. Por consiguiente, en un aspecto, la

invención proporciona métodos que comprenden la administración de un antagonista de ALK-1 (tal como una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1), seguido de la administración de un agente quimioterapéutico.

Como entenderán los expertos habituales en la técnica, las dosis apropiadas de los agentes quimioterapéuticos serán aproximadamente las ya empleadas en terapias clínicas en las que los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. La variación de la dosificación probablemente se producirá dependiendo de la afección que vaya a tratarse. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

ALK-1

El receptor ALK-1 es un receptor de tipo I de la familia de receptores de TGF β específico de células endoteliales. El gen de ALK-1 codifica un polipéptido de 503 aminoácidos e incluye un dominio de unión a ligando hidrófilo, rico en cisteína, una sola región transmembrana hidrófoba y una parte intracelular C terminal, que consiste principalmente en dominios de serina/treonina quinasa. El número de registro del ALK-1 humano es CAA80255 y el número de registro del ALK-1 de ratón es CAA83484.

Las mutaciones en el gen de ALK-1 se han asociado a telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 2. Durante muchos años se consideró que el ALK-1 era un receptor huérfano. Aunque anteriormente se especulaba que el TGF β 1 y el TNF β 3 eran ligandos de ALK-1, recientemente se han identificado los ligandos BMP9 y BMP10 como ligandos fisiológicos de ALK-1 (David, L. *et al.*, Blood 109: 1953-1961 (2007)). Se ha mostrado que la activación de ALK-1 induce la fosforilación de Smad1, Smad5 y Smad8.

Antagonistas de ALK-1

En el apartado de "Definiciones" del presente documento se contempla una lista ejemplar y no limitante de antagonistas de ALK-1 (tales como un anticuerpo anti-ALK-1 y una inmunoadhesina de ALK-1).

Los antagonistas de ALK-1 útiles en la presente divulgación pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y por sus funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los antagonistas de ALK-1 se caracterizan por uno cualquiera o más de: unión a ALK-1, unión a uno o más ligandos de ALK-1, por ejemplo, BMP9 o BMP10, reducción o bloqueo de la activación del receptor de ALK-1, reducción o bloqueo de la señalización molecular aguas abajo de ALK-1 (por ejemplo, fosforilación de Smad 1, Smad 5 y/o Smad 8), alteración o bloqueo de la unión de BMP9 o BMP10 a ALK-1, inhibición de la angiogénesis, inhibición de linfangiogénesis, tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión de ALK-1. En la técnica se conocen métodos para caracterizar antagonistas de ALK-1 y algunos de ellos se describen e ilustran en el presente documento.

Inmunoadhesinas de ALK-1

Las inmunoadhesinas, incluyendo su estructura y preparación, se describen, por ejemplo, en el documento WO 91/08298; y en las Patentes de Estados Unidos N° 5.428.130 y 5.116.964.

Producción de una inmunoadhesina o adhesina heteromultimérica quimérica

La descripción que se indica a continuación se refiere principalmente a la producción de inmunoadhesinas cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de inmunoadhesina. Por supuesto, se contempla que para preparar inmunoadhesinas pueden emplearse métodos alternativos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, usando técnicas en fase sólida, puede producirse la secuencia de inmunoadhesina, o partes de la misma, mediante síntesis peptídica directa (véase, por ejemplo Steward *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática puede realizarse, por ejemplo, usando un Sintetizador Peptídico de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Diversas partes de la inmunoadhesina pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir la inmunoadhesina de longitud completa.

El ácido nucleico que codifica un receptor ALK-1 de secuencia nativa, puede, por ejemplo, aislarse de células que se sabe que expresan el receptor ALK-1. El número de registro del ADNc de ALK-1 humano es Z22533 y el número de registro del ADNc de ALK-1 de ratón es Z31664.1.

El ADN que codifica las regiones constantes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se conoce o ya está disponible en bibliotecas de ADNc o está sintetizado. Véase, por ejemplo, Adams *et al.*, Biochemistry 19: 2711-2719 (1980); Gough *et al.*, Biochemistry 19: 2702-2710 (1980); Dolby *et al.*; P.N.A.S. USA, 77: 6027-6031 (1980); Rice *et al.* P.N.A.S. USA 79: 7862-7865 (1982); Falkner *et al.*; Nature 298: 286-288 (1982); y Morrison *et al.*; Ann. Rev. Immunol. 2: 239-256 (1984).

Una inmunoadhesina o una adhesina heteromultimérica (heteroadhesina) quimérica de la invención se produce preferentemente por expresión en una célula hospedadora y se aísla de la misma. Generalmente una célula hospedadora se transforma con el ácido nucleico de la invención. Preferentemente el ácido nucleico se incorpora en un vector de expresión. Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión de los vectores del presente documento incluyen células hospedadoras procariotas (tales como *E. coli*, cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y otras bacterias), levaduras y otros microbios eucariotas y células eucariotas superiores (tales como células de ovario de hámster Chino (CHO) y otras células de mamífero). Las células también pueden estar presentes en animales vivos (por ejemplo, en vacas, cabras u ovejas). También pueden usarse células de insecto. En la técnica se conocen bien metodologías de clonación y expresión.

Para obtener la expresión de una inmunoadhesina, tal como la molécula ALK1.Fc (descrita con detalle en el Ejemplo 1), uno o más vectores de expresión se introducen en células hospedadoras por transformación o transfección y las células hospedadoras recombinantes resultantes se cultivan en medios con nutrientes convencionales, modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, selección de células recombinantes, o amplificación del ADN de ALK1.Fc. En general, principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamífero *in vitro* pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Construcción de ácido nucleico que codifica una inmunoadhesina

Cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, preferentemente el ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de un receptor natural se fusiona en el extremo C del ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, también son posibles fusiones en el extremo N. Normalmente, en dichas fusiones, el polipéptido quimérico codificado conservará al menos funcionalmente, la bisagra, los dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan en el extremo C de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente en el extremo N de CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. La construcción de fusión de ADN resultante se expresa en células hospedadoras apropiadas.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos de dominios extracelulares de secuencia nativa (tal como el dominio extracelular de ALK-1) y/o las secuencias del anticuerpo usadas para preparar la inmunoadhesina deseada, se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural o preparación por mutagénesis mediada (o dirigida al sitio) por oligonucleótidos, mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión de una variante preparada con anterioridad o una versión que no es de una variante, de un ALK-1 de secuencia nativa.

Las variantes de secuencias de aminoácidos de dominio extracelular de secuencia nativa incluidas en la heteroadhesina quimérica se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en la secuencia de ADN de dominio extracelular nativa, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido monomérico de la heteroadhesina quimérica deseada. Dichas variantes incluyen, por ejemplo deleciones o inserciones o sustituciones de restos en la secuencia de aminoácidos de la inmunoadhesina o heteroadhesina quimérica.

Pueden realizarse variaciones en la secuencia nativa, como las descritas anteriormente, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices utilizadas para efectuar mutaciones conservativas y no conservativas.

En una realización, el ácido nucleico codifica una molécula quimérica en la que la secuencia del dominio extracelular del receptor ALK-1 se fusiona con el extremo N de la parte C terminal de un anticuerpo (en particular el dominio Fc), que contiene las funciones efectoras de una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG₁. Es posible fusionar toda la región constante de cadena pesada con la secuencia del dominio extracelular del receptor ALK-1. Sin embargo, más preferentemente, en la fusión se usa una secuencia que comienza en la región bisagra justo aguas arriba del sitio de escisión con papaína (que define químicamente la parte Fc de la IgG; resto 216, considerando que el primer resto de la región constante de la cadena pesada es 114 (Kobet *et al.*, citados anteriormente), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas). En una realización, la secuencia del dominio extracelular del receptor de ALK-1 se fusiona con la región bisagra y con los dominios CH2 y CH3 o con CH1, con la región bisagra, con los dominios CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG₁, IgG₂ o IgG₃. El sitio exacto en el que se realiza la fusión no es crítico y el sitio óptimo puede determinarse a través de experimentación habitual.

Para inmunoadhesinas humanas, se prefiere el uso de secuencias de inmunoglobulina IgG₁ e IgG₃ humana. Una ventaja principal de usar IgG₁ es que las inmunoadhesinas de IgG₁ pueden purificarse eficazmente en proteína A inmovilizada. Por el contrario, la purificación de IgG₃ requiere proteína G, un medio significativamente menos versátil. Sin embargo, cuando se selecciona el compañero de fusión de Ig para una construcción de inmunoadhesina particular, deben tenerse en cuenta otras propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, la bisagra de la IgG₃ es más larga y más flexible, de manera que puede dar cabida a dominios de "adhesina" más largos, que pueden no plegarse o que funcionan correctamente cuando se fusionan con la IgG₁. Otra consideración puede ser la valencia; las inmunoadhesinas de IgG son homodímeros bivalentes, mientras que los subtipos de Ig, tales como IgA e IgM pueden dar lugar a estructuras díméricas o pentaméricas, respectivamente, de

la unidad homodimérica de Ig básica.

Para las inmunoadhesinas de ALK-1 diseñadas para la aplicación *in vivo*, las propiedades farmacocinéticas y las funciones efectoras especificadas por la región Fc son también importantes. Aunque todas las IgG₁, IgG₂ e IgG₄ tienen semividas *in vivo* de 21 días, sus potencias relativas activando el sistema del complemento son diferentes. La IgG₄ no activa el complemento y la IgG₂ es significativamente más débil en la activación del complemento de que lo es la IgG₁. Además, a diferencia de la IgG₁, la IgG₂ no se une a receptores de Fc en células mononucleares ni en neutrófilos. Aunque la IgG₃ es óptima para la activación del complemento, su semivida *in vivo* es aproximadamente un tercio de la de los otros isotipos de IgG.

Otra consideración importante para las inmunoadhesinas diseñadas para utilizar como agentes terapéuticos en seres humanos, es el número de variantes alotípicas del isotipo particular. En general, se prefieren isotipos de IgG con menos alotipos serológicamente definidos. Por ejemplo, la IgG₁ tiene solo cuatro sitios alotípicos serológicamente definidos, dos de los cuales (Glm1 y 2) se localizan en la región Fc; y uno de estos sitios Glm1, no es inmunogénico. En cambio, en la IgG₃ hay 12 alotipos serológicamente definidos, estando todos ellos en la región Fc; teniendo solo tres de estos sitios (G3m5, 11 y 21) un alotipo que no es inmunogénico. Por tanto, la posible inmunogenicidad de una inmunoadhesina de IgG₃ es mayor que la de una inmunoadhesina de IgG₁.

Los ADNc que codifican la secuencia del receptor ALK-1 (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular) y las partes Ig de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plásmido que dirige la expresión eficaz en las células hospedadoras seleccionadas. Para la expresión en células de mamífero, pueden usarse vectores basados en pRK5 (Schall *et al.*, Cell 61, 361-370 (1990)) y vectores basados en CDM8 (Seed, Nature 329, 840 (1989)). La unión exacta puede crearse retirando las secuencias extra entre los codones de unión diseñados usando mutagénesis de delección dirigida por oligonucleótidos (Zoller y Smith, Nucleic Acids Res. 10, 6487 (1982); Capon *et al.*, Nature 337, 525-531 (1989)). Pueden usarse oligonucleótidos sintéticos, en los que cada mitad es complementaria a la secuencia del otro lado de la unión deseada; de manera ideal, estos tienen de 36 a 48 unidades monoméricas. Como alternativa, para unir las dos partes de la molécula en fase con un vector apropiado pueden usarse técnicas de PCR.

En una realización, un polipéptido de heteroadhesina quimérica comprende una fusión de un monómero de la heteroadhesina quimérica con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. Dichas formas con etiqueta epitópica de la heteroadhesina quimérica son útiles, ya que su presencia puede detectarse usando un anticuerpo marcado contra el polipéptido etiqueta. Además, al proporcionar la etiqueta epitópica se permite que la heteroadhesina quimérica pueda purificarse fácilmente por purificación de afinidad, usando el anticuerpo anti etiqueta. En la técnica se conocen bien polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Como ejemplos se incluyen el polipéptido etiqueta HA gripal y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology 5(12): 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glucoproteína D (gD) del virus del Herpes Simple y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)).

Otro tipo de modificación covalente de un heteromultímero quimérico comprende ligar un polipéptido monomérico del heteromultímero con uno de varios polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y propilenglicol. Un heteromultímero quimérico también puede incluirse microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente) en sistemas coloidales de liberación de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción de inmunoadhesinas y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados, según sea apropiado, para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por el experto en la técnica sin experimentación excesiva. En general, los principios; protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, citados anteriormente.

Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico de la invención puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora, o puede existir como un elemento extracromosómico. Los expertos habituales en la técnica conocen métodos de transfección en células eucariotas y de transformación en células procariotas, por ejemplo, usando CaCl₂, CaPO₄ y electroporación mediada por liposomas. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. Generalmente, para procariotas, se usa el tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, como describen Sambrook *et al.*, citados

anteriormente, o la electroporación. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de determinadas células vegetales, como describen Shaw *et al.*, en Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978).

5 En la Patente de Estados Unidos Nº 4.399.216 se describen aspectos generales sobre transfecciones en sistemas hospedadores de células de mamífero. Las transformaciones en levaduras se realizan normalmente según el método de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130: 946 (1977) y de Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros medios para introducir ADN en las células, tales como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por

10 ejemplo, polibreno, poliornitina. Para las diversas técnicas de transformación en células de mamífero, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336: 348-352 (1988).

Como células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento se incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* se encuentran disponibles para el público, tales como la cepa de *E. coli* K12, MM294 (ATCC 31.446); la cepa X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y la cepa K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella* así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitativos. La cepa W3110 es una cepa hospedadora habitual para la fermentación de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por

25 ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas en el hospedador, con ejemplos de dichos hospedadores que incluyen la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplasmática mutante desvelada en la Patente de Estados Unidos Nº 4.946.783 presentada el 7 de agosto de 1990. Como alternativa, son adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, la reacción de la PCR u otras reacciones de polimerasas de ácido nucleico.

Además de microbios procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son hospedadores adecuados para la clonación o expresión para vectores que codifican inmunoadhesinas. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior usado habitualmente. Otros hospedadores incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos Nº 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)) tal como, por ejemplo *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154(2): 737-1742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1998]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero sin limitación, levaduras que pueden crecer en metanol seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. En C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982), puede encontrarse un listado de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de inmunoadhesinas glucosiladas proceden de organismos multicelulares. Como ejemplos de células de invertebrado se incluyen células de insecto, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster Chino (CHO) y COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivos de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster Chino/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula hospedadora apropiada se incluye en las capacidades de la técnica.

En general, la elección de una línea de célula hospedadora de mamífero para la expresión de inmunoadhesinas de ALK-1 depende principalmente del vector de expresión. Otra consideración es la cantidad de la proteína que se requiere. Con frecuencia pueden producirse cantidades en miligramo mediante transfecciones transitorias. Por ejemplo, la línea celular de riñón embrionario humano 293 transformada por adenovirus con EIA, puede transfectarse transitoriamente con vectores basados en pRK5 mediante una modificación del método del fosfato de calcio para permitir la expresión eficaz de la inmunoadhesina. Pueden usarse vectores basados en CDM8 para transfectar células COS mediante el método de DEAE-dextrano (Aruffo *et al.*, Cell 61, 1303-1313 (1990); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. (US) 9, 347-353 (1990)). Si se desean cantidades más grandes de proteína, la inmunoadhesina puede expresarse después de la transfección estable de una línea de célula hospedadora. Por ejemplo, puede introducirse un vector basado en pRK5 en células de ovario de hámster Chino (CHO) en presencia de un plásmido adicional que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) y que confiere resistencia a G418. Pueden seleccionarse clones resistentes a G418 en cultivos; estos clones crecen en presencia de niveles en aumento de metotrexato, un inhibidor de DHFR; se seleccionan clones en los que el número de copias de genes que codifican las secuencias de la DHFR y de inmunoadhesina se amplifican conjuntamente. Si la inmunoadhesina contiene una secuencia líder hidrófoba en su extremo N, es probable que las células transfectadas la procesen y secreten. La expresión de inmunoadhesinas con estructuras más complejas puede requerir células hospedadoras exclusivamente adecuadas; por ejemplo, pueden proporcionarse componentes, tales como una cadena ligera o una cadena J, mediante determinados hospedadores de células de mieloma o hibridoma (Gascoigne *et al.*, 1987, citado anteriormente; Martin *et al.*, J. Virol. 67, 3561-3568 (1993)).

Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico que codifica una inmunoadhesina puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Diversos vectores se encuentran disponibles al público. El vector puede estar, por ejemplo, en la forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio (o sitios) de endonucleasas de restricción apropiado, usando técnicas conocidas en la materia. Generalmente los componentes del vector incluyen, pero sin limitación, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplean técnicas de ligamiento convencionales conocidas por el experto en la técnica.

La inmunoadhesina puede producirse de manera recombinante, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido homólogo, que puede ser una secuencia señal, u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN que codifica la inmunoadhesina que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestables. Para la secreción en levaduras la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura o el líder del factor alfa (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, esta última descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362,179 publicado el 4 de abril de 1990) o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646 publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como líderes secretorios virales.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias son muy conocidas para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

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

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes que captan el ácido nucleico que codifica la inmunoadhesina, tal como DHFR o timidina quinasa. Cuando se emplea DHFR de tipo silvestre, una célula hospedadora apropiada es la línea celular CHO con déficit en cuanto a actividad DHFR, preparada y propagada como se describe en Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10: 157 (1980)). El gen *trp1* proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que no puede crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85: 12

(1977)).

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la inmunoadhesina para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por diversas posibles células hospedadoras son muy conocidos. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de β lactamasa y lactosa (Chang *et al.*, Nature, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281: 544 (1979)), fosfatasa alcalina, un sistema de promotor triptófano (trp) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776) y promotores híbridos tales como el promotor tac (deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)). Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno, unida operativamente al ADN que codifica la inmunoadhesina.

Como ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levaduras se incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)) o de otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de controlar la transcripción mediante condiciones de cultivo, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, del isocitocromo C, de la fosfatasa ácida, de enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Adicionalmente, en el documento EP 73.657, se describen vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levaduras.

La transcripción de inmunoadhesinas a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como poliovirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, retrovirus (tal como virus del sarcoma aviar), citomegalovirus, virus de la hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40); de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

La transcripción de un ADN que codifica la inmunoadhesina por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, normalmente con 10 a 300 pb aproximadamente, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Como ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (por 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante de inmunoadhesina, pero preferentemente se localiza en el sitio 5' desde el promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias se encuentran normalmente disponibles a partir de las regiones 3' no traducidas de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica la inmunoadhesina.

En Gething *et al.*, Nature, 293: 620-625 (1981); en Mantei *et al.*, Nature, 281: 40-46 (1979) y en los documentos EP 117.060 y documento EP 117.058, se describen otros métodos, vectores y células hospedadoras adicionales, adecuados para la adaptación a la síntesis de inmunoadhesinas en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

Purificación y caracterización de inmunoadhesinas

Una inmunoadhesina o una heteroadhesina química se recupera preferentemente del medio de cultivo a medida que el polipéptido la va secretando, aunque también puede recuperarse a partir de lisados de células hospedadoras. Como una primera etapa, el residuo de partículas, bien células hospedadoras o fragmentos lisados, se retira, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína puede concentrarse con un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, seguido de la separación de la heteroadhesina química de otras impurezas mediante uno o más procedimientos de purificación seleccionados de: fraccionamiento en una columna de inmunofinidad; fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con sulfato de

amonio o etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice; cromatografía en heparina-sefarosa; cromatografía en una resina de intercambio de cationes; cromatografía en SDS-PAGE; y filtración en gel.

Un método particularmente ventajoso para purificar inmunoadhesinas es la cromatografía de afinidad. La elección del ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo del dominio Fc de la inmunoglobulina que se use en la quimera. Se puede usar proteína A para purificar inmunoadhesinas basadas en las cadenas pesadas de IgG₁, IgG₂ o IgG₄ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62, 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la IgG3 humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5, 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero también se dispone de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como las de vidrio de poro controlado o de poli(estireno divinil)benceno permiten obtener caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los obtenidos con la agarosa. Las condiciones de unión de una inmunoadhesina a una columna de afinidad de proteína A o G se rigen completamente por las características del dominio Fc; es decir, su especie e isotipo. Generalmente, cuando se selecciona el ligando apropiado, se produce una unión eficaz directamente a partir del fluido de cultivo no acondicionado. Otro rasgo diferenciador de las inmunoadhesinas es que, para las moléculas de IgG₁ humana, la capacidad de unión de la proteína A está algo disminuida con respecto a la de un anticuerpo del mismo tipo de Fc. La inmunoadhesina unida puede eluirse eficazmente bien a pH ácido (a o por debajo de 3,0), o en un tampón de pH neutro que contenga una sal ligeramente caotrópica. Esta etapa de cromatografía de afinidad puede dar como resultado una preparación de inmunoadhesina que tenga una pureza de >95 %.

En lugar de, o además de, cromatografía de afinidad en proteína A o G, para purificar las inmunoadhesinas, pueden usarse otros métodos conocidos en la materia. Las inmunoadhesinas se comportan de manera similar a los anticuerpos en una cromatografía de gel tiorfílico (Hutchens y Porath, Anal. Biochem. 159,217-226 (1986)) y una en cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados (Al-Mashikhi y Makai, J. Dairy Sci. 71, 1756-1763 (1988)). Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos, su comportamiento en columnas de intercambio iónico no solo se rige por sus puntos isoeléctricos sino también por un dipolo de carga que puede existir en las moléculas debido a su naturaleza quimérica.

La preparación de inmunoadhesinas etiquetadas con epítipo facilita la purificación usando una columna de inmunofinidad que contenga un anticuerpo contra el epítipo para adsorber el polipéptido de fusión.

En algunas realizaciones, las inmunoadhesinas de ALK-1 se ensamblan como monómeros, o hetero- u homomultímeros, dímeros o tetrámeros, esencialmente como se ilustra en el documento WO 91/08298. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existe la IgG, IgD e IgE. En las inmunoglobulinas de mayor peso molecular se repite una estructura de cuatro unidades; la IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA y ocasionalmente la globulina IgG, también puede existir en forma multimérica en suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

Generalmente, las inmunoadhesinas de ALK-1 de la invención tendrán una cualquiera o más de las siguientes propiedades: ser capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de ALK-1 incluyendo, por ejemplo, la reducción o el bloqueo de la activación del receptor ALK-1, la reducción o el bloqueo de la señalización molecular de ALK-1 aguas abajo, por ejemplo, fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8, la alteración o el bloqueo de ligandos de ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) que se unen a ALK-1.

Anticuerpos

En un ejemplo los anticuerpos anti-ALK-1 son monoclonales. También se incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos anti-ALK-1 proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática o pueden generarse mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles con fines diagnósticos y terapéuticos expuestos más adelante.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos salvo por posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en pequeñas cantidades. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos distintos.

Los anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 pueden prepararse usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para suscitar linfocitos que produzcan, o sean capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína que se utiliza para la inmunización. Los anticuerpos contra ALK-1 generalmente se suscitan en animales

mediante inyección múltiple subcutánea (sc) o intraperitoneal (ip) de ALK-1 y un adyuvante. ALK-1 puede prepararse usando métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, más adelante se describe la producción recombinante de ALK-1. En una realización, los animales se inmunizan con un derivado de ALK-1 que contiene el dominio extracelular (DEC) de ALK-1 fusionado a la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En otra realización, los animales se inmunizan con una proteína de fusión ALK-1-IgG₁. Habitualmente, los animales se inmunizan contra conjugados o derivados inmunogénicos de ALK-1 con monofosforil lípido A (MPL)/ dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas después los animales reciben dosis de refuerzo. Después de 7 a 14 días se extrae la sangre de los animales y se analiza en suero la titulación del anti-ALK-1. Los animales reciben dosis de refuerzo hasta obtener niveles estables de títulos.

Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan de un modo eficaz, mantienen una producción a alto nivel estable del anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferibles son las líneas de mieloma murino, tales como las procedentes de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón, disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland USA. Las líneas de células de heteromieloma de ser humano-ratón y de mieloma 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, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se somete a ensayo con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra ALK-1. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos de especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores productores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, del fluido ascítico o del suero mediante procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos anti-ALK-1 pueden prepararse usando bibliotecas combinatorias para explorar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan explorando fagotecas que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable (Fv) del anticuerpo fusionada a una proteína de recubrimiento de fagos. Dichas fagotecas se seleccionan por cromatografía de afinidad contra el anticuerpo deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y de este modo se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones de unión se eluyen después del antígeno y pueden posteriormente enriquecerse mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-ALK-1 puede obtenerse diseñando un procedimiento de exploración de antígenos adecuado para seleccionar el clon del fago de interés seguido de la construcción de un anticuerpo anti-ALK-1 de longitud completa usando las secuencias Fv del clon del fago de interés y las secuencias de región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de

aproximadamente 110 aminoácidos, en cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse funcionalmente en fagos, bien como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL se unen mediante enlace covalente a través de un péptido flexible, corto, o como fragmentos Fab, en los que cada uno de ellos está fusionado con un dominio constante e interacciona de un modo no covalente, como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, la codificación de clones de fagos de scFv y la codificación de clones de fagos de Fab recibe en su conjunto el nombre de "clones de fagos Fv" o "clones de Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse por separado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en fagotecas, que después pueden investigarse con respecto a los clones de unión a antígeno, como describen Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin tratar puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos contra una amplia serie de autoantígenos y también de no autoantígenos sin ninguna inmunización, como describen Griffiths *et al.*, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse sintéticamente bibliotecas sin tratar, clonando los segmentos de genes V no reordenados de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias al azar para codificar las regiones CDR3 altamente variables y realizar el reordenamiento *in vitro*, como describen Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Se usan fagos filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión con la proteína de recubrimiento minoritaria pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv monocatenarios, en los cuales los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como describen Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena está fusionada a la proteína pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde se ensamblan a una estructura proteica de recubrimiento Fab que comienza a presentarse en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de recubrimiento de tipo silvestre, por ejemplo, como describen Hoogenboom *et al.*, Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos génicos de anticuerpo se obtienen a partir de células inmunitarias extraídas de seres humanos o de animales. Si se desea una biblioteca sesgada a favor de clones anti-ALK-1, el sujeto se inmuniza con ALK-1 para generar una respuesta de anticuerpos y de la construcción de la biblioteca se recuperan esplenocitos y/o células B u otros linfocitos de sangre periférica (PBL) circulantes. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de clones anti-ALK-1 generando una respuesta de anticuerpos anti-ALK-1 en ratones transgénicos portadores de una matriz de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcional) de tal manera que la inmunización con ALK-1 da lugar a células B productoras de anticuerpos humanos contra ALK-1. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional de poblaciones de células reactivas anti-ALK-1 puede obtenerse usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar células B que expresan anticuerpos unidos a membrana específicos de ALK-1, por ejemplo, mediante separación celular con una cromatografía de afinidad de ALK-1 o adsorción de células a ALK-1 marcada con fluorocromo seguido de separación celular activada por fluorescencia (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*).

Como alternativa, el uso de esplenocitos y/o células B u otros PBL de un donante no inmunizado ofrecen una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que la ALK-1 no sea antigénica. Para bibliotecas que incorporan una construcción génica de anticuerpos *in vitro*, se extraen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos génicos de anticuerpo no reordenados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse de diversas especies animales, tales como de ser humano, ratón, rata, de especies de lagomorfos, lupinos, caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos y aves, etc.

El ácido nucleico que codifica los segmentos génicos variables del anticuerpo (incluyendo los segmentos VH y VL) se extrae de las células de interés y se amplifica. En el caso de genotecas de VH y VL reordenadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores emparejando los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), por lo tanto fabricando diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con retrocebadores en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos con base dentro del segmento J como describen Orlandi *et al.* (1989) y Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para la amplificación a partir de ADNc, los retrocebadores también pueden basarse en el exón líder como describen Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991) y los cebadores directos dentro de la región constante como describen Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degeneración en los cebadores como describen Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). Preferentemente, la

diversidad de la biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos contra cada familia de genes V para amplificar todas las disposiciones VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de las células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Forum *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en los vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción inusuales dentro del cebador de PCR como una etiqueta en un extremo, como describen Orlandi *et al.* (1989), o mediante amplificación adicional por PCR con un cebador etiquetado como describen Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

A partir de segmentos de genes V pueden obtenerse *in vitro* repertorios de genes V reordenados sintéticamente. La mayor parte de los segmentos de genes VH humanos se ha clonado, secuenciado (descrito en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)) y mapeado (descrito en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud, como describen Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden fabricarse repertorios de genes VH centrandos todas las diversas de secuencias en un bucle H3 largo de un solo tramo, como describen Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos V κ y V λ humanos se han clonado y secuenciado (descrito en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes V sintéticos, basándose en una serie de plegamientos de VH y VL y de longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN que codifican genes V, los segmentos del gen V de línea germinal pueden reordenarse *in vitro* según los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Combinando entre sí de diversas maneras repertorios de genes VH y VL, pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpos. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores y los vectores pueden recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como describen Hogrefe *et al.*, Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, mediante el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). La estrategia de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación de *E. coli*. Los repertorios VH y VL no tratados se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos bibliotecas se combinan después mediante infección con fagos de bacterias que contienen fagémidos de tal manera que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca está limitado solamente por el número de células presente (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de tal manera que los genes VH y VL se recombinan sobre un solo replicón y se empaquetan conjuntamente en los viriones de los fagos. Estas inmensas bibliotecas proporcionan grandes cantidades de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse a la vez por PCR y después clonarse, por ejemplo, como describen Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje por PCR también puede usarse para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica adicional, se usa "ensamblaje por PCR en la célula" para combinar genes VH y VL en linfocitos mediante PCR y después clonar repertorios de genes unidos como describen Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratar (bien naturales o sintéticas) pueden tener afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M), pero la maduración por afinidad también puede simularse *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de bibliotecas secundarias como describen Winter *et al.* (1994), citados anteriormente. Por ejemplo pueden introducirse mutaciones al azar *in vitro* usando la polimerasa propensa a error (descrita en Leung *et al.*, Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración por afinidad puede realizarse mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores portadores de secuencias al azar abarcando la CDR de interés, en clones Fv individuales y explorando clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un método para introducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia eficaz de recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante presentación de fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorar la alta afinidad en diversas rondas de reorganización de cadenas como describen Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^{-9} M.

En la técnica se conocen secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de ALK-1 y también se describen en el presente documento. Mediante diversos métodos conocidos en la técnica, pueden prepararse los ADN que codifican ALK-1. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, síntesis química mediante cualquiera de los métodos descritos en Engels *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tal como los métodos de triéster, fosfito, fosforamídita y H-fosfonato. En una realización, los codones preferidos por la célula hospedadora de expresión se usan en el diseño del ADN que codifica ALK-1. Como alternativa, el ADN que codifica ALK-1 puede aislarse de una

biblioteca genómica o de ADNc.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica ALK-1, la molécula de ADN se une operativamente a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, en el que la secuencia de control es reconocida por una célula hospedadora transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y de control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora. Habitualmente el vector lleva a un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. En la técnica se conocen vectores adecuados para la expresión en células procariotas y eucariotas y algunas de ellas se describen a continuación en el presente documento. Pueden usarse organismos eucariotas, tales como levaduras o células procedentes de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica ALK-1 está unido operativamente a una secuencia líder secretora dando como resultado la secreción del producto de expresión por la célula hospedadora en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder secretoras incluyen stII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuado para su uso en el presente documento la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen *et al.*, EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Las células hospedadoras se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente de la presente invención y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora tanto si las secuencias codificantes se expresan realmente como si no lo hacen. El experto habitual en la técnica conoce numerosos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. El éxito de la transfección generalmente se reconoce cuando dentro de la célula hospedadora se produce cualquier indicación de la operatividad de este vector. En la técnica se conocen bien métodos de transfección y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

Transformación significa introducción de ADN en un organismo de tal manera que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. En la técnica se conocen bien métodos de transformación y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

Las células hospedadoras procariotas usadas para producir ALK-1 pueden cultivarse como se describe en líneas generales en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Las células hospedadoras de mamífero usadas para producir ALK-1 pueden cultivarse en diversos medios, bien conocidos en la técnica y algunos de los cuales se describen en el presente documento. Las células hospedadoras a las que se hace referencia en la presente divulgación incluyen células en cultivo *in vivo* así como células que están dentro de un animal hospedador.

La purificación de ALK-1 puede realizarse usando métodos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

La ALK-1 purificada puede unirse a una matriz adecuada tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de hidroxil metacrilato, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nylon, vehículos neutros e iónicos y similar para su uso en la separación por cromatografía de afinidad de clones de presentación de fagos. La unión de la proteína ALK-1 con la matriz puede realizarse mediante los métodos descritos en Methods in Enzymology, vol. 44 (1976). Una técnica normalmente empleada para unir ligandos de proteína con matrices de polisacáridos, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del vehículo con haluros de cianógeno y posterior acoplamiento de las aminas alifáticas o aromáticas primarias del ligando peptídico con la matriz activada.

Como alternativa, la ALK-1 puede usarse para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en la separación de células o conjugarse con biotina para la captura con perlas recubiertas con estreptavidina o usarse en cualquier otro método bien conocido en la técnica para la selección de bibliotecas de presentación de fagos.

Las muestras de fagotecas se ponen en contacto con la ALK-1 inmovilizada en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y similar se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen con un ácido, por ejemplo, como describen Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o con una base, por ejemplo, como describen Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o mediante competición antigénica con ALK-1, por ejemplo, en un procedimiento similar al del método de

competición antigénica de Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una sola ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden crecer en cultivo bacteriano y someterse a rondas de selección posteriores.

- 5 La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y de si los fragmentos de anticuerpo múltiples en un solo fago pueden acoplarse simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y débil afinidad de unión) pueden conservarse mediante el uso de lavados reducidos, la presentación de fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece que el
- 10 fago que se ha disociado vuelva a unirse. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buena afinidad de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados prolongados y la presentación de fagos monovalentes como se describe en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690 y una baja densidad de recubrimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992).
- 15 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, de ALK-1. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo como se realiza en algunas de las técnicas de maduración por afinidad descritas anteriormente) probablemente da lugar a muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno y algunos con mayor afinidad. Con ALK-1 limitante, podrían competir fagos inusuales de alta afinidad. Para conservar todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden
- 20 incubarse con un exceso de ALK-1 biotinilado, pero con ALK-1 biotinilado a una concentración de molaridad menor que la constante de afinidad molar ideal para ALK-1. Los fagos de unión de alta afinidad pueden después capturarse con perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite seleccionar anticuerpos según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con tan solo una afinidad dos veces mayor de un gran exceso mayor de fagos con afinidad más baja. Las condiciones
- 25 usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para diferenciar en función de la cinética de disociación.

Los clones anti-ALK-1 pueden seleccionarse activamente. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-ALK-1 que reducen o bloquean la activación de receptor ALK-1, reducen o bloquean la señalización molecular

30 aguas abajo de ALK-1, por ejemplo, fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8 o alteran o bloquean los ligandos de ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) que se unen a ALK-1.

- El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones Fv de presentación de fagos se aísla y se secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de cadena pesada y ligera de interés a partir del molde de ADN del hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que, de otra modo, no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras
- 35 recombinantes. Como artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos se incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

- El ADN que codifica los clones Fv puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat *et al.*, citados anteriormente) para formar clones que codifican cadenas ligeras y/o pesadas de longitud completa o parcial. Se apreciará que, para este fin pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. En la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido", como se usa en el presente documento, se incluye un clon de Fv procedente de ADN de dominio variable de una especie animal (tal como de un ser humano) y después fusionado con ADN de una región constante de otra especie animal, para formar una o más secuencias codificantes para un "híbrido", de cadena ligera y/o cadena pesada de longitud completa. En una realización preferida, un clon Fv procedente de ADN de región variable humana se fusiona con ADN de región constante humana para formar una o más secuencias codificantes para todas las cadenas ligera y/o pesada de
- 45
- 50
- 55 longitud parcial o completa humana.

El ADN que codifica un anticuerpo anti-ALK-1 procedente de un hibridoma también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de secuencias murinas homólogas procedentes del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento procedente del clon de Fv o hibridoma puede modificarse adicionalmente mediante unión covalente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos procedentes del clon de Fv o del clon de hibridoma.

Fragmentos de anticuerpo

La presente divulgación incluye fragmentos de anticuerpo. En determinadas circunstancias hay ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo en vez de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una rápida eliminación y puede conducir a mejorar el acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical y Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, en la actualidad, estos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse en y secretarse de *E. coli* permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las fagotecas de anticuerpo indicadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. En la Patente de Estados Unidos Nº 5.869.046 se describen los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida aumentada *in vivo*, que comprenden restos epítópicos de unión a un receptor de salvamento. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; y las Patentes de Estados Unidos Nº 5.571.894; y 5.587.458. Los fragmentos Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que no tienen regiones constantes; por tanto son adecuados para la unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión con sFv para producir una fusión de una proteína efectora, bien en el extremo amino o en el carboxi de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La presente divulgación incluye anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener introducidos uno o más restos de aminoácidos a partir de una fuente que no sea humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados" que normalmente se extraen de un dominio variable "importado". La inmunización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239: 1534-1536) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos de los restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto de cadena pesada como ligera, a usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "de ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta después como la región marco conservada humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196: 901. Otro método usa una región marco conservada particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Puede usarse la misma región marco conservada para diferentes anticuerpos humanizados (Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151: 2623.

Adicionalmente es importante que los anticuerpos estén humanizados conservando una alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método, mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales se preparan anticuerpos humanizados usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Normalmente, se dispone de modelos tridimensionales de inmunoglobulinas que son familiares para los expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite realizar análisis de los posibles papeles de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor e importadas, de tal manera que se obtenga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable intervienen directamente y sustancialmente en ejercer influencia sobre la unión con el antígeno.

Anticuerpos humanos

Como se ha descrito anteriormente, pueden construirse anticuerpos humanos anti-ALK-1 combinando una o más secuencias de dominio variable de clones de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos procedentes de ser humano, con una o más secuencias de dominio constante humano conocidas. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti-ALK-1 monoclonales humanos mediante el método de hibridoma. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito líneas de células de heteromieloma de ser humano-ratón y de mieloma de ser humano, por ejemplo, Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, después de la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH, *Joining Heavy*) del anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal y quimérica, da como resultado una completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición antigénica. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse transposición de genes para obtener anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. Según este método, también denominado "impronta epitópica", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación de fagos, como se ha descrito anteriormente, se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humano creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/humana. La selección con el antígeno da como resultado el aislamiento de una scFv o Fab quimérica de cadena no humana/humana en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido después de la retirada de la correspondiente cadena no humana en el clon de presentación de fago primario, es decir, el epítipo dirige (marca con una impronta) la elección del compañero de la cadena humana. Cuando el proceso se repite para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril, 1993). A diferencia de lo que ocurre con la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferentemente anticuerpos humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En este caso, una de las especificidades de unión es para ALK-1 y la otra es para cualquier otro antígeno. Los anticuerpos específicos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína ALK-1. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos contra células que expresan ALK-1. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a ALK-1 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o un hapteno de isótopo radioactivo). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En la técnica se conocen métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena ligera – cadena pesada de inmunoglobulina, en el que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo distintas, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien engorrosa y los rendimientos de producto son pobres. En el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker *et al.*, *EMBO* 10, 3655-3659 (1991) se desvelan procedimientos similares.

De acuerdo con una estrategia diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se fusionan con las secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos en parte la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de 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 distintos y se transfectan conjuntamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones con proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción que proporciona rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para las dos o tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión si la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en igual proporción produce rendimientos superiores o si las

proporciones no son importantes.

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

Según otra estrategia, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recupera del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de igual tamaño o similar con respecto a una o más cadenas largas en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales largas de aminoácidos por unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tal como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina y el otro con biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, contra células diana del sistema inmunitario no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Pueden fabricarse anticuerpos heteroconjugados usando cualquiera de los métodos de entrecruzamiento convenientes. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con diversas técnicas de entrecruzamiento.

En la bibliografía también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81(1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, el arsenito sódico, para estabilizar ditioles próximos e impedir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Después uno de los derivados de TNB-Fab' vuelven a convertirse en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado TNB-Fab' para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífica completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secreta por separado de *E. coli* y se somete a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado puede unirse a células que sobreexpresan el receptor de HER2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor mamario humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidizaron para formar heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse 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 la preparación de fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos usando dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

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

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente mediante una célula que exprese un antígeno al cual se unan los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que no sean de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que la cadena (o cadenas) polipeptídica comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena (o cadenas) polipeptídica puede comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena (o cadenas) polipeptídica puede comprender: la cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o la cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende preferentemente además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Variantes de anticuerpo

En algunas realizaciones, se contemplan una o más modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción y sustitución se realiza para conseguir la construcción final, siempre que esta última posea las características deseadas. Pueden introducirse alteraciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo en cuestión, en el momento en el que se realiza la secuencia.

Un método útil para identificar determinados restos o regiones del anticuerpo, que son localizaciones preferidas para la mutagénesis, se denomina "mutagénesis mediante alanina", como describen Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. En este caso, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se redefinen después introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaliza de la mutación por sí misma no requiere predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio determinado, se efectúa mutagénesis al azar o con alanina en el codón o región diana y se explora la actividad deseada de las inmunoglobulinas expresadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos sencillos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o con un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

La glucosilación de polipéptidos está normalmente ligada a N o ligada a O. La glucosilación ligada a N se refiere a la unión de la fracción carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno o más de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para

sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición, o sustitución, de uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

- 5 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº US 2003/0157108 (Presta, L.) se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo. Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). En el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y en la Patente de Estados Unidos Nº 6.602.684, Umana *et al.*, se mencionan anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectada en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo. En el documento WO 10 1997/30087, Patel *et al.*, se mencionan anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo. Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.
- 15 La variante de glucosilación preferida del presente documento comprende una región Fc, en la que una estructura carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos en su interior adicionalmente con función ADCC mejorada, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de restos Eu). Como ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos 20 “desfucosilados” o “con déficit de fucosa” se incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Como ejemplos de líneas celulares productoras de anticuerpos desfucosilados se incluyen células CHO Lec13 con déficit 25 en fucosilación proteica (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares con genosupresión (*knockout*), como las células CHO con genosupresión del gen FUT8 que codifica la alfa-1,6-fucosiltransferasa (Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).
- 30 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en las FR. En la Tabla 2, en la columna “sustituciones preferidas” se muestran sustituciones conservativas. Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares” en la Tabla 2, o como se describe adicionalmente más adelante en 35 referencia a las clases de aminoácidos y los productos pueden explorarse.

Tabla 2

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

Se obtienen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en cuanto a su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos en función de las propiedades de su cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe

Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases por el de otra clase.

Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante (o variantes) resultante seleccionada para desarrollo posterior tendrá propiedades biológicas mejoradas con respecto a las del anticuerpo parenteral del cual se genera. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, se mutan diversos sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se presentan desde partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Después, las variantes de presentación de fagos se exploran con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis con alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión antigénica. Como alternativa, o de manera adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que dichas variantes se generan, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

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

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

De conformidad con esta descripción y con las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunos ejemplos, un anticuerpo usado en los métodos puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservarían sustancialmente las mismas características necesarias para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se piensa que en la región Fc pueden realizarse determinadas alteraciones que darían como resultado una unión a Clq y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir mejorada o disminuida), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322: 738-40 (1988); la Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; la Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y el documento WO94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). En el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*) se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada con el receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc sobre con una o más sustituciones en su interior con unión mejorada de la región Fc a FcRn. En la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642 se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas en la región Fc y capacidad de unión a Clq aumentada o disminuida. Véase también, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos pueden modificarse adicionalmente para que contengan fracciones no proteicas adicionales que se conocen en la técnica y de las que se dispone fácilmente. Preferentemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Como ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles se incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de propilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no. El número de polímeros unido al anticuerpo puede variar y si se une más de un polímero, este puede ser la misma molécula o diferente. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización puede determinarse en función de consideraciones que incluyen, sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

Exploración de anticuerpos con propiedades deseadas

Los anticuerpos pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por uno cualquiera o más de: unión a ALK-1, reducción o bloqueo de la activación de receptor ALK-1, reducción o bloqueo de la señalización molecular aguas abajo del receptor ALK-1 (por ejemplo, fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8), alteración o bloqueo de la unión de ligandos de ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) con ALK-1, inhibición de angiogénesis, inhibición de linfangiogénesis, tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer, tratamiento o prevención de un trastorno asociado a expresión y/o actividad de ALK-1.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse adicionalmente mediante una serie de ensayos incluyendo, sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida a alta presión (HPLC) con exclusión por tamaño no desnaturizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En determinadas realizaciones de la invención, se analiza la actividad biológica de los anticuerpos producidos en el presente documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se someten a ensayo para determinar su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno conocidos en la técnica y que pueden usarse en el presente documento incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de unión directa o competitiva, usando técnicas tales como transferencia de western, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo alterado que posee algunas funciones efectoras, aunque no todas, que hacen que éste sea un candidato deseado para muchas aplicaciones, donde la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, incluso determinadas funciones efectoras (tales como las del complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En determinadas realizaciones, para garantizar que solo se conservan las propiedades deseadas, se miden las actividades Fc de la inmunoglobulina producida. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/empobrecimiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por tanto posiblemente careciendo de actividad ADCC), pero conserva capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). En las Patentes de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337 se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés. Como células efectoras útiles para realizar dichos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o de manera adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). Pueden realizarse también ensayos de unión a Clq para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a Clq y que por tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). También puede determinarse la unión al FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo, los descritos en el apartado Ejemplos.

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas

oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Se dispone de muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora que vaya a usarse. Generalmente, se prefieren células hospedadoras de origen procariota o eucariota (generalmente de mamíferos). Se apreciará que para esta finalidad pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de especies humanas o animales.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas:

10 Construcción de vectores

Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifiquen componentes polipeptídicos del anticuerpo usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas pueden aislarse y secuenciarse de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidos, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Para la finalidad de la presente invención pueden usarse muchos vectores disponibles y conocidos en la técnica. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y de la célula hospedadora particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogos o ambas cosas) y de su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, en relación con estos hospedadores, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora. Habitualmente el vector lleva a un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido procedente de una especie de *E. coli*. El plásmido pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR322, sus derivados u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos también pueden contener, o modificarse, para que contengan promotores que pueda usar el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. En Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.648.237, se describen con detalle ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares.

Además, como vectores de transformación o junto con estos hospedadores pueden usarse vectores de fagos que contengan secuencias de replicón y control que sean compatibles con el microorganismo hospedador. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tal como λ GEM™-11 preparando un vector recombinante que pueda usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como LE392 de *E. coli*.

El vector de expresión puede comprender dos o más pares promotor-cistrón, codificando cada uno de ellos los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas se incluyen normalmente en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

En la técnica se conocen bien una gran cantidad de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede estar unido operativamente a ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores homólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten realizar una mayor transcripción y ofrecer mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas del promotor de PhoA, de la β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Se han publicado sus secuencias nucleotídicas, permitiendo por tanto a un experto en la técnica ligar operativamente los cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción necesario.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana.

En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para esta finalidad de la presente invención debe ser una que reconozca y procese (es decir, escindida mediante una peptidasa de señal) la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen ni procesan las secuencias señal nativas con respecto a los

- 5 polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina II termoestables, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos
- 10 cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o sus variantes.
- 15 En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistron. En este sentido, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas hospedadoras (por ejemplo, la

cepa trxB de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el correcto plegamiento y ensamblaje de la subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para la expresión de anticuerpos incluyen arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos Gram negativos y Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen

20 *Escherichia*, (por ejemplo *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo *B. subtilis*), enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gram negativas. En una realización, se usan células de *E. coli* como hospedadores para la invención. Como ejemplos de cepas de *E. coli* se incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987),

25 págs. 1190-1219; N° de Depósito 27.325 de la ATCC) y sus derivados, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT(Δ nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de Estados Unidos N° 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ , 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) son también adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitativos. En la técnica se conocen métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas

30 anteriormente que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la capacidad del replicón para replicarse en las células de una bacteria. Por ejemplo, como hospedador pueden usarse adecuadamente *E. coli*, especies de *Serratia* o *Salmonella* cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410, para proporcionar el replicón. Normalmente la célula hospedadora debe

35 secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y, a ser posible, en el cultivo celular pueden incorporarse inhibidores de proteasa adicionales.

Producción de anticuerpos

- 40 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducción de ADN en el hospedador procariota, de tal manera que el ADN pueda replicarse, como un elemento extracromosómico o mediante un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El

45 tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras sustanciales en la pared celular. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica usada es la electroporación.

- 50 Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (LB, Luria Broth) con complementos nutritivos necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, seleccionándose basado en la construcción del vector de expresión, para
- 55 permitir el crecimiento selectivo de células procariotas que contengan el vector de expresión. Por ejemplo, a los medios para el crecimiento de células que expresan gen de resistencia a penicilina se añade ampicilina.

Cualquiera de los complementos necesarios, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, también pueden incluirse a concentraciones apropiadas, introducidos solos o como una mezcla con otro complemento o

60 medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglucolato, ditiogeritrol y ditiotreitrol.

- Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por
- 65 ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente de aproximadamente 30 °C. El

pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4 y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si en el vector de expresión se usa un promotor inducible, la expresión de la proteína se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para el control de la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). En la técnica se conocen diversos otros inductores que pueden usarse, según el vector de construcción empleado.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células hospedadoras y se recuperan del mismo. La recuperación de la proteína generalmente implica la alteración del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, ultrasonido o lisis. Una vez alteradas las células, los desechos celulares o las células enteras se retiran por centrifugación o filtración. Posteriormente las proteínas pueden purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía con resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse en los medios de cultivo y aislarse en su interior. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante del cultivo filtrarse y concentrarse para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse posteriormente e identificarse usando métodos habitualmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Se dispone de diversos procedimientos de fermentación semidiscontinua a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Los fermentadores a gran escala tienen una capacidad de al menos 1000 litros, preferentemente una capacidad de aproximadamente 1.000 a 100.000 litros. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). Una fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a una fermentación en un fermentador que tiene una capacidad volumétrica de no más de aproximadamente 100 litros y que puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia normalmente después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ejemplo, a una DO550 de aproximadamente 180-220, fase en la que las células están en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse diversos inductores, según el vector de construcción empleado, como se sabe en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos de tiempo más cortos antes de la inducción. Normalmente las células se inducen durante aproximadamente 12-50 horas, aunque también pueden usarse tiempos de inducción más largos o más cortos.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el correcto ensamblaje y plegamiento de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (un peptidilprolil *cis*, *trans*-isomerasa con actividad chaperona) para la transformación conjunta de las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el correcto plegamiento y solubilidad de las proteínas heterólogas producidas en las células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse determinadas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas de la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una o más mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y sus combinaciones. Algunas cepas de *E. coli* con déficit de proteasas, están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.* (1998), citados anteriormente; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

En una realización, cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se usan como células hospedadoras en el sistema de expresión.

Purificación de anticuerpos

En la técnica se conocen y pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmutafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o

sobre resina de intercambio de cationes, tal como DEAE, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, la Proteína A inmovilizada en una fase sólida se usa para una purificación de inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa. La proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida a la cual se inmoviliza la Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o de sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, con intención de prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como una primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se describe anteriormente se aplica sobre la Proteína A inmovilizada en fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la Proteína A. Después, la fase sólida se lava para retirar contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas:

Los componentes del vector generalmente incluyen, sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componentes de la secuencia señal

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que reconoce y procesa (es decir, se escinde mediante una peptidasa señal) la célula hospedadora. En la expresión de células de mamífero, se dispone de secuencias señal de mamífero, así como de señales líderes secretoras virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN de dicha región precursora está ligado en fase de lectura al ADN que codifica el anticuerpo,

Origen de replicación

Generalmente, un componente del origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solo debido a que contiene el promotor temprano.

Selección de los componentes del gen

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como los genes de DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente de metalotioneína de primates, adenosín desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, primero se identifican células transformadas con el gen de selección de DHFR, cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada en la que se emplea DHFR de tipo silvestre, es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) con déficit de actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o transformadas conjuntamente con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) mediante cultivo celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la

Patente de Estados Unidos Nº 4.965.199.

Componentes del promotor

5 Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico del polipéptido del anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

15 La transcripción de polipéptidos de anticuerpos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero la controla, por ejemplo, promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus 40 de Simio (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico siempre de dichos promotores que sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

20 Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convencionalmente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el papilomavirus bovino como un vector se desvela en la Patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Una modificación de ese sistema se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Como alternativa, como promotor puede usarse el Virus del Sarcoma de Rous con una larga repetición terminal.

Componentes de elementos potenciadores

30 La transcripción del ADN que codifica el polipéptido del anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores a menudo aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conoce muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, normalmente, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Como ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma del lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el polipéptido del anticuerpo, pero preferentemente se localiza en el sitio 5' del promotor.

Componentes de terminación de la transcripción

45 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas normalmente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias se encuentran normalmente disponibles a partir de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

Selección y transformación de células hospedadoras

50 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, en las que se incluyen las células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivos en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W 138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

5

Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles en el comercio tales como Ham F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), en las patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; en los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o en la Patente Re US 30.985 pueden usarse como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/o con otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), anticuerpos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y una fuente de energía de glucosa o equivalente. Cualquier otro complemento necesario también puede incluirse a concentraciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como, la temperatura, el pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y resultarán obvias para el experto habitual en la técnica.

25

Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los desechos de partículas, fragmentos de células hospedadoras o de lisis, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las etapas anteriores puede incluirse un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes ocasionales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominios Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La Proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que estén basados en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La Proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero también se dispone de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como las de vidrio de poro controlado o de poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden conseguirse con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas de purificación de proteínas, tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase Inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía sobre SEPHAROSE™ o una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también se encuentran disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

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

Inmunconjugados

La divulgación del presente documento contempla inmunconjugados (indistintamente denominados "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprende un anticuerpo anti-ALK-1 conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o sus fragmentos) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de los agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999)

Anticancer Research 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26: 151-172; patente de Estados Unidos 4.975.278) permite la administración dirigida de la fracción de fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular en su interior, cuando la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles de toxicidad inaceptables a las células normales así como a las células tumorales que se desea eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera *et al.* (ed.s), págs. 475-506). Es por esto que se busca una eficacia máxima con mínima toxicidad. Los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87). Los fármacos que se utilizan en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) citados anteriormente). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.* (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler *et al.* (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623) y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman *et al.* (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342). Las toxinas pueden afectar a su citotoxicidad y efectos citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión al ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tiende a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o con ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y, unidos mediante un quelante – enlazador de tiourea (Wiseman *et al.* (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman *et al.* (2002) Blood 99(12): 4336-42; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69). Aunque el ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma no Hodgkin (NHL) de linfocitos B, la administración da como resultado citopenia grave y prolongada en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco-anticuerpo compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patentes de Estados Unidos Nº 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco-anticuerpo compuesto por el anticuerpo huC242 unido mediante el enlazador de disulfuro SPP a la fracción de fármaco maitansinoide, DM1, se está desarrollando en ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de cánceres, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros, que expresan CanAG. El MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco-anticuerpo compuesto por el anticuerpo monoclonal contra el antígeno de membrana prostático específico (PSMA) ligado a la fracción de fármaco maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos contra Lewis Y en carcinomas) y con cAC10 (específicos contra CD30 en cánceres hematológicos) (Doronina *et al.* (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En el presente documento se describen agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunconjugados (véanse, por ejemplo, los citados anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas, que pueden usarse incluyen la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modeccina A, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Como ejemplos se incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento a proteínas, tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metilditielen triaminopentacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar de conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

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

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez en el arbusto africano *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Las fracciones de fármaco maitansinoide son fracciones de fármaco atractivas en conjugados de fármaco-anticuerpo, porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) tratables para la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra diversas líneas de células tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos y sus usos terapéuticos se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.208.020, 5.416.064 y en la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era muy citotóxico contra células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, u otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado A7- maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante enlace químico de un anticuerpo con una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo mostró eficacia potenciando la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso podía esperarse que una molécula de toxina/anticuerpo potenciase la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en otras patentes y en publicaciones que no son patentes, indicadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de enlazadores conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) y en la Patente de Estados Unidos Nº US 2005169933. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se desvela en la Patente de Estados Unidos Nº US 2005169933. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos acidolábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasalábiles o grupos esterásalábiles, como se desvela en las patentes identificadas anteriormente, siendo los grupos disulfuro y tioéter los preferidos. En el presente documento se describen e ilustran grupos de enlace adicionales.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide pueden prepararse usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento a proteínas, tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede estar unido a una molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20

que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, la unión se realiza en la posición C-3 del maitansinol o una análogo de maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolastatina, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos N° 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) y que tienen actividad anticancerosa (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2961-2965). La fracción de fármaco de dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o del extremo C (carboxilo) de la fracción de fármaco peptídica (documento WO 02/088172).

Como realizaciones ejemplares de auristatina se incluyen fracciones farmacológicas DE y DF de monometilauristatina ligadas al extremo N, desveladas en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Patente de Estados Unidos N° US 2005238649.

Normalmente, las fracciones farmacológicas basadas en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más fragmentos de aminoácidos y/o peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schroder y K. Lubke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de péptidos. Las fracciones farmacológicas de auristatina/dolastatina pueden prepararse según los métodos de: los documentos US 5635483; US 5780588; Pettit *et al* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; Pettit *et al* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit, G. R., *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit *et al* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5: 859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Patente de Estados Unidos N° US 2005238649 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos para la preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugado a enlazadores).

Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas ellas de la Compañía American Cyanamid). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación γ 1I, α 2I, α 3I, N-acetil- γ 1I, PSAG y θ 1I (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de la Compañía American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que puede conjugarse con el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpos, potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agente antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozotocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos en su conjunto como complejo LL-E33288, descrito en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como, esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

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

La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo muy radioactivo. Se dispone de diversos isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Como ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para la detección, este puede comprender un átomo radioactivo para efectuar estudios escintigráficos, por ejemplo, $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también

conocido como formación de imágenes por resonancia magnética, (irm), tal como, de nuevo, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

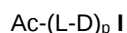
Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores adecuados de aminoácidos en los que interviene, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{121} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse mediante un resto de cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse mediante un resto de lisina: el método IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos con detalle.

Pueden prepararse conjugados de anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento a proteínas, tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador acidolábil, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo, o un enlazador que contenga disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020).

Los compuestos contemplan expresamente, pero sin limitación, conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC, *antibody drug conjugates*) preparados con reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran disponibles en el comercio (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de fármaco-anticuerpo

En los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC), un anticuerpo (Ac) se conjuga una o más fracciones de fármaco (D, *drug*), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 fracciones de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazador (L, *linker*). El ADC de Fórmula I puede prepararse mediante diversas vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo: (1) la reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar un Ac-L mediante un enlace covalente, seguido de reacción con una fracción de fármaco D y (2) la reacción de un grupo nucleófilo de una fracción de fármaco con un reactivo enlazador bivalente para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. En el presente documento se describen métodos adicionales para preparar ADC.



El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlazador ejemplares incluyen 6-maleimidocaproil ("MC"), maleimidopropanoil ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), *N*-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), *N*-Succinimidil 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y *N*-Succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato ("SIAB"). En la técnica se conocen componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Patente de Estados Unidos Nº US 2005238649.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes de enlazador de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido, o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen; glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente de enlazador de aminoácido incluyen aquellos de origen natural así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes de enlazador de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en cuanto a su selectividad para la escisión enzimática mediante enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

En anticuerpos, los grupos nucleófilos incluyen, sin limitación: (i) grupos de amina N terminal, (ii) grupos de amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos de tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína y (iv) grupos de amino o hidroxilo de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos de amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos

y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación, con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos de tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o su fragmento) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

También puede producirse conjugados de fármaco-anticuerpo por modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrófilas, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco enlazador. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la parte carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con oxidasa galactosa o metaperyodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N terminal pueden reaccionar con metaperyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en el lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con una fracción de fármaco o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en una fracción de fármaco incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimido

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el direccionamiento previo al tumor, en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada de la circulación del conjugado no unido usando un agente de eliminación y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Modificaciones covalentes en los polipéptidos de ALK-1

Las modificaciones covalentes de los antagonistas polipeptídicos de la divulgación (por ejemplo, un fragmento antagonista polipeptídico, una molécula de fusión a ALK-1, tal como una inmunoadhesina de ALK-1, o un anticuerpo anti-ALK-1) se incluyen dentro del ámbito de la presente divulgación. Estas modificaciones pueden realizarse mediante síntesis química o mediante escisión enzimática o química del polipéptido, si fuera aplicable. Otro tipo de modificaciones covalentes de los polipéptidos se introducen en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácidos diana del polipéptido con un agente orgánico derivatizante y que pueden reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con restos N o C terminales o incorporando un aminoácido modificado o no natural en la cadena polipeptídica en crecimiento, por ejemplo, Ellman *et al.* *Meth. Enzym.* 202: 301-336 (1991); Noren *et al.* *Science* 244: 182 (1989); y publicaciones de solicitud de Patentes de Estados Unidos 20030108885 y 20030082575.

Los restos cisteinilo más habitualmente reaccionan con α -haloacetatos (y aminas correspondientes), tal como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos cisteinilo también derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozilo)propiónico, cloroacetil fosfato, *N*-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil-2-piridil disulfuro, *p*-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los restos histidilo derivatizan por reacción con dietilpirocarbonato a pH de 5,5-7,0 ya que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El para-bromofenacil bromuro es también útil; la reacción se realiza normalmente en cacodilato sódico 0,1 M a pH de 6,0.

Los restos aminoterminales y lisinilo reaccionan con ácido succínico u con otros ácidos carboxílicos anhídridos. La derivatización con estos agentes invierte la carga de los restos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar

restos que contienen α -amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimidato, piridoxal fosfato, peridoxal, cloroborohidrido, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción con glioxilato catalizada por transaminasas.

- 5 Los restos arginilo se modifican por reacción con uno o diversos reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo amino épsilon arginina.
- 10 La modificación específica de los restos tirosilo puede realizarse, con particular interés introduciendo marcadores espectrales en restos tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más habitualmente *N*-acetilimidazol y tetranitrometano se usan para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los restos tirosilo se marcan con yodo usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayos.
- 15 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas ($R-N=C=N-R'$), en la que R y R' son grupos alquilo diferentes, tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo se transforman en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.
- 20 Los restos glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente a los restos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos restos están desamidados en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos restos se incluyen en el ámbito de la presente invención.
- 25 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina e histidina de las cadenas laterales (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N terminal y la amidación del grupo carboxilo C terminal.
- 30 Otro tipo de modificación covalente implica acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a un polipéptido de la invención. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren la producción del polipéptido en una célula hospedadora que tiene capacidades de glucosilación para la glucosilación ligada a N o ligada a O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar (o azúcares) puede unirse a (a) una arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, 35 treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981).
- 40 La retirada de cualquiera de las fracciones de carbohidrato presentes en un polipéptido de la invención puede realizarse química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del polipéptido al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto la unión del azúcar (*N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina), al mismo tiempo que deja el polipéptido intacto. La desglucosilación química la describen Hakimuddin, *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987) y Edge *et al. Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981).
- 45 La escisión enzimática de fracciones carbohidrato, por ejemplo, en anticuerpo puede realizarse mediante el uso de varias endo y exoglucosidasas como describen Thotakura *et al. Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987).
- Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de la invención comprende la unión del polipéptido a una de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera 50 expuesta en las Patentes de Estados Unidos N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Formulaciones farmacéuticas

- 55 Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo o una inmunoadhesina de la divulgación se preparan para su conservación, mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20ª edición (2000)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras formulaciones deshidratadas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; 60 antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como 65 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; contraiones formadores de sal tales como sodio, complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

- 5 La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que vaya a tratarse, preferentemente aquellos que tienen actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito al cual está destinado.
- 10 Los principios activos también pueden estar incluidos en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, una microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y poli(metilmelacrilato), respectivamente en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000).
- 15

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto puede realizarse fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

- 20 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos idóneos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol polivinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y
- 25 γ etil-L-glutamato, etilvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido glucólico, ácido láctico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros, tales como etilvinil acetato y ácido láctico - ácido glucólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la
- 30 humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Estrategias lógicas pueden idearse para la estabilización, dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es una formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede realizarse modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a
- 35 partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

- Adicionalmente se contempla que un agente útil en la invención pueda introducirse a un sujeto por terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración del ácido nucleico a un sujeto. En
- 40 aplicaciones de terapia génica los genes se introducen en las células para conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo para el reemplazo de un gen defectuoso. La "terapia génica" incluye terapia génica tanto convencional, en la que se consigue un efecto duradero mediante un solo tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, lo que implica la administración una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Como agentes terapéuticos pueden usarse ARN antisentido y ADN o ARNip para bloquear la expresión de determinados genes *in vivo*. Se ha demostrado ya que los oligonucleótidos antisentido cortos pueden importarse en células donde actúan como inhibidores, a pesar de sus concentraciones intracelulares
 - 45 bajas causadas por su captación restringida por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 (1986)). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster con carga negativa por grupos sin carga. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase, por ejemplo Goldspiel *et al.* Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu y Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan Science 260: 926-932 (1993); Morgan y Anderson Ann.-Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); y May TIBTECH 11: 155-215 (1993). Los métodos habitualmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden usarse como se describe en Ausubel *et al.* eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; y Kriegler
 - 50 (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.
 - 55

Dosificación y administración

- 60 Las moléculas se administran a un paciente humano, en consonancia con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante administración intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o vías de inhalación y/o subcutánea.
- 65 En determinadas realizaciones, el tratamiento de la invención implica la administración combinada de un antagonista de ALK-1 y uno o más agentes contra el cáncer, por ejemplo agentes antiangiogénesis o agentes antilinfangiogénesis. En una realización, se presentan agentes adicionales contra el cáncer, por ejemplo, uno o más

diferentes agentes antiangiogénesis, uno o más agentes quimioterapéuticos etc. La invención también contempla la administración de inhibidores múltiples, por ejemplo, anticuerpos múltiples contra el mismo antígeno o anticuerpos múltiples contra diferentes moléculas activas de cáncer. En la realización, se administra un coctel de diferentes agentes quimioterapéuticos con el antagonista de ALK-1 y/o uno o más agentes antiangiogénesis. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones distintas o una sola formulación farmacéutica, y/o administración consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, un antagonista de ALK-1 puede preceder, ir después, alternar, con la administración de los agentes contra el cáncer, o puede proporcionarse simultáneamente con la misma. En una realización, hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada del antagonista de ALK-1 dependerá del sitio de enfermedad que vaya a tratarse, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y evolución de la enfermedad, de si el inhibidor se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de los antecedentes clínicos del paciente y de la respuesta al inhibidor y del criterio del médico tratante. El inhibidor se administra adecuadamente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos. En un régimen de terapia de combinación, las composiciones de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o en una cantidad terapéuticamente sinérgica. Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz es tal que la administración de una composición de la invención y/o la coadministración de un antagonista de ALK-1 y uno o más de otros agentes terapéuticos, da como resultado la reducción o la inhibición de la enfermedad o afección a la cual se dirige. El efecto de la administración de una combinación de agentes puede ser aditiva. En una realización, el resultado de la administración es un efecto sinérgico. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es esa cantidad de un antagonista de ALK-1 y uno o más agentes terapéuticos distintos, por ejemplo, un inhibidor de angiogénesis, necesario para reducir sinérgica o significativamente o eliminar las afecciones o los síntomas asociados con una enfermedad particular.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo de 0,1-20 mg/kg) del antagonista de ALK-1 o del inhibidor de angiogénesis es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Normalmente, el médico administrará una o más moléculas hasta alcanzar una o más dosis que proporcionen el efecto biológico deseado. El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Por ejemplo, la preparación y las pautas de dosificación para los inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, tales como AVASTIN® (Genentech) pueden realizarse según las instrucciones del fabricante o determinarlas empíricamente un experto en la materia. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) del antagonista específico de VEGF es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, tanto, por ejemplo mediante una o más administraciones distintas o mediante fusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, las dosificaciones particularmente deseables incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se trata el cáncer, medido por los métodos descritos anteriormente o conocidos en la técnica. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En un ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra una vez a la semana, cada dos semanas o cada tres semanas, a un intervalo de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg incluyendo, pero sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. El progreso de la terapia de la invención se monitorizarse fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

En un ejemplo, bevacizumab es el antagonista específico de VEGF. El bevacizumab se proporciona para usos terapéuticos en viales de un solo uso, sin conservantes, de 100 mg a 400 mg, para administrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). El producto de 100 mg se formula en 240 mg de α,α- trehalosa deshidratada, 23,2 mg de fosfato sódico (monobásico, monohidrato), 4,8 mg de fosfato sódico (dibásico, anhidro), 1,6 mg de polisorbato 20 y Agua para Inyección, USP. El producto de 400 mg se formula en 960 mg de α,α- trehalosa deshidratada, 92,8 mg de fosfato sódico (monobásico, monohidrato), 19,2 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 6,4 mg de polisorbato 20 y Agua para Inyección, USP.

En otro ejemplo, la preparación y las pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden realizarse según las instrucciones del fabricante o como determine empíricamente el experto en la técnica. La preparación y las pautas de dosificación para quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Eficacia del tratamiento

La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante diversos criterios de valoración normalmente usados en la evaluación de trastornos neoplásicos o no neoplásicos. Por ejemplo, los tratamientos del cáncer pueden evaluarse, por ejemplo, sin limitación, mediante regresión del tumor, peso del tumor o reducción del tamaño del mismo, tiempo hasta la progresión, duración de supervivencia, supervivencia sin progresión, tasa de respuesta global, duración de la respuesta y calidad de vida. Dado que los agentes antiangiogénesis descritos en el presente documento se dirigen a la vasculatura tumoral y no necesariamente a las propias células neoplásicas, estos representan una exclusiva clase de fármacos contra el cáncer y por lo tanto pueden requerir mediciones y definiciones exclusivas de respuestas clínicas a fármacos. Por ejemplo, la reducción del tumor de más del 50 % en un análisis bidimensional es el límite estándar para declarar en respuesta. Sin embargo, los inhibidores pueden causar inhibición de la propagación metastásica sin reducción del tumor primario o pueden simplemente ejercer un efecto estático tumoral. Por consiguiente, pueden emplearse estrategias para determinar la eficacia de la terapia incluyendo, por ejemplo, la medición de marcadores en plasma u orina de angiogénesis o la medición de respuestas a través de imágenes radiológicas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben considerarse como limitantes de las enseñanzas del presente documento.

Ejemplo

Ejemplo 1: generación de una molécula ALK1.Fc

Usando técnicas de biología molecular convencionales, se generó una molécula ALK1.Fc uniendo el dominio extracelular de ALK-1 (restos de aminoácidos 1-118 de ALK-1 humana) con la región Fc de la IgG₁ humana mediante un enlazador polipeptídico. En resumen, un fragmento extracelular de la ALK-1 humana (aminoácidos 1-118) se subclonó en un vector pRK5 que se había diseñado para la expresión de una proteína de fusión con un Fc C-terminal de la IgG₁ humana. La ALK1.Fc se purificó, mediante cromatografía de afinidad con Proteína A, del medio acondicionado recogido del cultivo sin suero de células CHO transfectadas de manera transitoria con el plásmido de expresión. La molécula ALK1.Fc tenía las siguientes secuencias de ADNc y de aminoácidos:

Secuencia del ADNc de ALK1.Fc:

```
ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGA
CCCAGGGAGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTG
AGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACACAGTAGTGC
TGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACTTGC
ACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCG
ACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCC
TTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGACCGGTGTACCGACAAAGCTGCGCA
CTATACTCTGTGCCACCGTGCCAGCACTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGTGGCCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT
GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEC ID N°: 1)
```

Secuencia de la proteína ALK1.Fc:

MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLV
 REEGRHPQEHRCGNLHRELRCRGRPTFVNHYCCDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQP
 GTDGQTGVTDKAAHYTLCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 2)

Ejemplo 2: el tratamiento con ALK1.Fc potencia el brote de células endoteliales *in vitro*

5 El efecto de la inhibición de la señalización de ALK-1 sobre el crecimiento de células endoteliales se exploró usando el ensayo con perlas de gel de fibrina en células HUVEC. Los detalles de este ensayo se han descrito anteriormente (Nakatsu, MN, Microvascular Research 44: 102-112 (2003)). En resumen, 3 perlas Cytodex (Amersham Pharmacia Biotech) se recubrieron con 350-400 células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) por perla en 2 ml de medio de EGM-2 (Clonetics). Aproximadamente, 200 perlas recubiertas con HUVEC se embebieron en un coágulo de fibrina en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 12 pocillos. Se sembraron 80×10^3 células de fibroblasto humano D551 en la parte superior del coágulo y el medio se cambió cada 2 días. Se añadió ALK1.Fc al medio de cultivo a 5 ug/ml. El día 9 se tomaron imágenes con microscopía de contraste de fase.

15 Las HUVEC que crecían en geles de fibrina en presencia de células de fibroblastos humanos cultivadas conjuntamente generaron brotes con una estructura distinta de tipo lumen (Nakatsu, M. N. *et al.* Microvasc Res 66, 102-112 (2003)). La adición de ALK1.Fc aumentó enormemente la longitud de los brotes (Figura 1), lo que sugiere que el bloqueo de la señalización de ALK-1 permite que las células endoteliales se adapten a un comportamiento más exploratorio. Estos resultados indican que ALK1.Fc fue capaz de afectar a las células endoteliales secuestrando el ligando ALK-1 e impidiendo la activación de ALK-1 endógeno.

Ejemplo 3: el tratamiento con ALK1.Fc afecta al desarrollo vascular de la retina *in vivo*

Se utilizaron ratas SD neonatales de la misma camada para estudiar el efecto de ALK1.Fc sobre el desarrollo vascular de la retina. Las ratas recibieron inyección i.p. de ALK1.Fc (10 mg/kg de peso corporal) el día 4 postnatal (P4), P6 y P9. El P11, las ratas se anestesiaron con isoflurano. Se inyectó Lectina de *Lycopersicon esculentum* marcada con FITC (150 µg in 150 µl de NaCl al 0,9 %; Vector Laboratories) por vía intracardíaca y se dejó permanecer en circulación durante 3 minutos. Los ojos se extrajeron y se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante una noche, seguido por lavados con PBS. Las retinas diseccionadas se bloquearon con suero de cabra al 10 % en PBST (PBS, Tritón X-10 al 0,5 %) durante 3 h, después se incubaron durante una noche con anticuerpo anti-alfa actina de musculo liso (ASMA, 1:200, Sigma-Aldrich) conjugado con isolectina B4 biotinilada (1:100, *Bandeiraea simplicifolia*; Molecular Probe) o con Cy3, con suero de cabra al 10 % en PBST. Para visualizar la isolectina B4 biotinilada, las retinas se lavaron después, 4 veces en PBST y se incubaron durante una noche con Cy3-estreptavidina (1:200, Sigma-Aldrich). Después de finalizar la tinción, las retinas se lavaron 4 veces con PBST. Todas las incubaciones nocturnas se realizaron a 4 °C. Se tomaron imágenes de retinas montadas en horizontal mediante microscopía de fluorescencia confocal.

35 La retina de rata postnatal temprana desarrolla un modelo vascular estereotípico en una secuencia de eventos bien definida: La vasculatura superficial de la retina se desarrolla como una red en expansión desde la cabeza del nervio óptico, con un brote activo en la periferia y remodelación extensiva del centro. Después, pueden realizarse fácilmente diferentes aspectos del desarrollo de los vasos, por ejemplo, brote de los vasos, remodelación, maduración y especificación arteriovenosa. En las retinas tratadas con ALK1.Fc, el patrón característico de arterias y venas radialmente alternas se vio mayormente no afectado. Sin embargo, hubo un claro aumento de la densidad vascular, especialmente en los microvasos cercanos a las venas (Isolectina-Cy3; Fig. 2). Además hubo una reducción drástica de la perfusión sanguínea de los microvasos y venas (Lectina-FITC; Figs. 3 y 4). Cabe destacar, que las arterias de la retina se agrandaron aparentemente, lo que recordaba el defecto vascular observado en embriones con déficit de Alk1. Además, las arterias de la retina agrandadas tienen una cobertura celular muscular vascular más laxa, desorganizada (ASMA; Fig. 3 y 4). Estos resultados indican que el tratamiento con ALK1.Fc podía afectar al desarrollo vascular en la retina de ratas neonatales interfiriendo con la señalización de ALK-1 *in vivo*.

Ejemplo 4: el tratamiento con ALK1.Fc inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

50 Para explorar si la señalización de ALK-1 está directamente implicada en el crecimiento tumoral, se ensayó el efecto de ALK1.Fc sobre la angiogénesis y sobre el crecimiento tumoral en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de tumor humano subcutáneo. Ratones desnudos de color beige (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se mantuvieron según la normativa para el cuidado y uso de animales de laboratorio. En cada estudio se usaron ratones hembra de seis a ocho semanas de vida. Para obtener tumores subcutáneos, los ratones recibieron una inyección de 0,1 ml de suspensión celular tumoral que contenía matrigel al 50% (BD Bioscience) en el costado posterior derecho. 5×10^6 células HM7 de cáncer de colon humano, 10×10^6 células MV-522 de carcinoma de pulmón

humano, 1×10^6 células C6 de glioblastoma de rata o 10×10^6 células Calu6 de carcinoma de pulmón humano se inyectaron en cada ratón. Se administró ALK1.Fc (10 mg/kg) vía i.p., de la siguiente manera: el tratamiento de HM7 con ALK1.Fc (c/2d) se inició 3 días después de la inoculación del tumor, el tratamiento de MV-522 con ALK1.Fc (c/2d) se inició 16 días después de la inoculación del tumor, el tratamiento de C6 con ALK1.Fc (2x/s) se inició 3 días después de la inoculación del tumor, el tratamiento de Calu6 con ALK1.Fc (c/2d) se inició 22 días después de la inoculación del tumor. El crecimiento tumoral se cuantificó con mediciones calibradas. El volumen tumoral (mm^3) se determinó midiendo la longitud (l) y la anchura (a) y calculando el volumen ($V = la^2/2$). En cada grupo se incluyeron de 10 a 15 animales.

- 10 El tratamiento con ALK1.Fc inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con vehículo (Figs. 5 y 6). El efecto sobre el crecimiento tumoral se observó en todos los modelos de tumor de xenoinjerto ensayados indicando que los efectos antitumorales observados no eran específicos del tipo de tumor.

Ejemplo 5: combinación de ALK1-Fc y anti-VEGF

- 15 El estudio del tumor HM7 descrito anteriormente en el Ejemplo 4, el tratamiento con ALK1.Fc comenzó tres días después de inyectar las células tumorales. La actividad de inhibición del crecimiento tumoral de ALK1.Fc se redujo cuando el tratamiento (10 mg/kg, c/3d) se inició nueve días después de la inoculación de las células tumorales (Figura 7). En este modelo el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF (B20-4.1, 5 mg/kg, c/3d) también fue menos eficaz cuando el tratamiento se retrasó. Sin embargo, se observó un efecto aditivo significativo cuando ambos agentes se usaban en combinación (Figura 7). El efecto combinado del anticuerpo anti-VEGF y ALK1.Fc también se estudió en el modelo de xenoinjerto LL2. Se inyectaron 5×10^6 células LL2 de carcinoma de pulmón de Lewis de ratón en cada ratón y el tratamiento con ALK1.Fc (10 mg/kg, c/2d) y el anticuerpo anti-VEGF (5 mg/kg, c/2d) se inició 2 días después de la inoculación del tumor. Los resultados muestran que la terapia de combinación en el modelo de tumor LL2 da como resultado una eficacia antitumoral mucho más grande en comparación con la monoterapia (Figura 8).

- El efecto del anticuerpo anti-VEGF y ALK1.Fc sobre la densidad vascular tumoral, evaluada con tinción de CD31, se examinó en el modelo de tumor LL2. El día 18 después de la inoculación de las células tumorales, los tumores se extirparon y se fijaron sumergiéndolos en paraformaldehído (PFA) al 1 % en PBS durante 2 h, seguido de incubación en sacarosa al 30 % durante una noche para la crioprotección. Las muestras se embebieron en OCT y se prepararon secciones de un grosor de $40 \mu\text{m}$ y se tiñeron con anti-CD31 de ratón (1:50, BD Pharmingen), seguido de anti-IgG de rata de cabra conjugado con FITC. Como se esperaba, el tratamiento solo con el anticuerpo anti-VEGF redujo significativamente la densidad vascular en los tumores tratados. Sin embargo, el tratamiento con ALK1.Fc, tuvo un efecto marginal sobre la densidad vascular tumoral. Curiosamente, el tratamiento con ambos agentes dio como resultado una reducción incluso más drástica de la densidad de los vasos tumorales (Figura 9), coherente con el efecto antitumoral aditivo. En su conjunto, estos resultados demuestran que el bloqueo de la señalización de ALK1 con ALK1.Fc podría tener una amplia eficacia antitumoral, especialmente cuando se combina con anti-VEGF.

40

Ejemplo 6: el tratamiento con ALK1-Fc afecta al desarrollo de la vasculatura linfática *in vivo*

- Se usaron ratones neonatales CD1 de la misma camada para estudiar el efecto de ALK1.Fc sobre la linfangiogénesis. Los ratones recibieron una inyección i.p. de ALK1.Fc ((10 mg/kg de peso corporal) el día posnatal 1 (P1), P3 y P6 y el tejido se recogió el P9. Se extrajeron los intestinos gruesos en bloque y aclararon con PBS. Para la piel de la cola, la dermis se separó de la epidermis, se lavó con PBS y se usó en tinción posterior. Los tejidos se fijaron durante 2 h con PFA al 4 % en PBS a temperatura ambiente. Después de bloquear con PHT1 (suero de cabra al 5 %, BSA al 0,2 %, Tritón X-100 al 0,5 %, NaN_3 en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente, los tejidos se incubaron durante una noche con anti-CD31 de rata (1:50, BD Pharmingen) y anti-LYVE-1 policlonal de conejo (1:500, Upstate), en PHT1. El anti rata de cabra secundario conjugado con AlexaFluor 488 (1:400, Molecular Probes) y el anti conejo de cabra conjugado con AlexaFluor594 (1:400, Molecular Probes) en PHT2 (BSA al 2 %, Tritón X-100 al 0,5 %, en PBS) se usaron para visualizar los complejos antígeno-anticuerpo. Después de finalizar la tinción, los tejidos se lavaron 4 veces en PBST (PBS, Tritón X-100 al 0,5 %), se fijaron posteriormente con PFA al 4 % en PBS durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y después se realizaron otros 4 lavados en PBS. Todas las incubaciones nocturnas se realizaron a 4 °C. Se tomaron imágenes de tejidos montados en horizontal con microscopía de fluorescencia confocal.

- En los intestinos delgados de ratones neonatales tratados con ALK1.Fc, los vasos sanguíneos capilares (tinción con CD31) en las vellosidades aparecieron normales aunque las vellosidades eran moderadamente más cortas que las del control (Figuras 10 y 11). A diferencia, los capilares linfáticos (tinción con LYVE-1) se vieron gravemente afectados. No podían extenderse completamente en las vellosidades y gran parte de ellos se detuvieron en la base de las vellosidades.

- La red vascular linfática dentro de la piel de la cola del ratón neonatal también se alteró drásticamente después del tratamiento con ALK1.Fc (Figura 12). El patrón característico similar a panal se alteró principalmente, solamente co vasos linfáticos desorganizados y fragmentados. Estos resultados indican que, además de su función crítica en la

regulación de la formación de vasos sanguíneos, la señalización de Alk1 es también esencial para el desarrollo postnatal de la vasculatura linfática.

Ejemplo 7: el tratamiento con ALK1-Fc afecta a la organización de los pericitos

Se examinó el efecto del tratamiento con ALK1.Fc sobre la organización de los pericitos en los vasos tumorales. Ratones desnudos de color beige recibieron inyección de 0,1 ml de suspensión celular tumoral que contenía matrigel al 50 % (BD Bioscience) en el costado posterior derecho. Se inyectaron 5×10^6 células TIB68 de leucemia monocítica de ratón (procedentes de BALB/c y que se piensa que representan un estadio temprano en la diferenciación de monocitos-mielocitos) en cada ratón para establecer tumores subcutáneos. Se administró Alk1.Fc (10 mg/kg) o vehículo control (PBS) mediante i.p. cada tres días. Los tratamientos se iniciaron al siguiente día después de la inoculación de las células y finalizaron 16 días después de la primera dosis. Los tumores se fijaron durante 2 horas en paraformaldehído (PFA) al 4 % a temperatura ambiente (TA), se aclararon en PBS, se transfirieron a sacarosa al 30 % a 4 °C durante una noche y se embebieron en OCT. Secciones de 80 μ m del tejido tumoral se lavaron en PBS, se bloquearon con PHT1 (PBS/suero de cabra al 10 %/Tritón X-100 al 0,5 %) a TA durante 2 horas y se incubó con anticuerpos primarios diluidos en PHT2 (PBS/suero de cabra al 2 %/Tritón X-100 al 0,5 %) a 4 °C durante una noche (anticuerpo de rata contra CD31 de ratón, 1:50, BD Pharmingen; anti-Desmina de conejo, 1:400, GeneTex). Después de cuatro lavados en PBS/Tritón X-100 al 0,2 %, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios (anti-rata de cabra Alexa 488; anti-conejo de cabra Alexa 594, 1:400, Molecular Probes) a TA durante 2 h. Las secciones se lavaron en PBS/Tritón X-100 al 0,2 % seguido de PBS, se fijaron con PFA al 4 % a TA durante 5 minutos y finalmente se lavaron con PBS. Estos resultados muestran que los vasos tumorales tratados con ALK1.Fc tienen pericitos mal organizados y separados (Fig. 13).

Ejemplo 8: generación de moléculas de inmunoadhesina de ALK1 adicionales

Para generar las siguientes moléculas adicionales se usaron técnicas de biología molecular convencionales:

Secuencia del ADNc de ALK1.Fc.2:

```
ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGA
CCCAGGGAGACCCCTGTGAAGCCGCTCTCGGGGCCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTG
AGAGCCCACATTGCAAGGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGC
TGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACTTGC
ACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCG
ACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACTCC
TTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGACCGGTGTCACCGACAAAACCTCACAC
ATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG
TGGTGCTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAATGAG (SEC ID N°: 3)
```

Secuencia de la proteína ALK1.Fc.2:

MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVVLV
REEGRHPQEHARGCGNLHRELGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLEATQPPSEQP
GTDGQTGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEC ID N°: 4)

Secuencia del ADNc de ALK1.Fc.3:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGA
CCCAGGGAGACCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTG
AGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGC
TGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACTTGC
ACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCG
ACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCC
TTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGACCGGTGACAAAACCTCACACATGCCC
ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGCCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCCGGGTAAATGA (SEC ID N°: 5)

5

Secuencia de la proteína ALK1.Fc3:

MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVVLV
REEGRHPQEHARGCGNLHRELGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLEATQPPSEQP
GTDGQTGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEC ID N°: 6)

10

Secuencia del ADNc de ALK1.Fc.4:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGA
CCCAGGGAGACCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTG
AGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGC
TGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACTTGC
ACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCG
ACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCC
TTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA

CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEC ID N°: 7)

Secuencia de la proteína ALK1.Fc4:

MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLV
REEGRHPQEHRCGNLHRELGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPPSEQP
GTDGQEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 8)

5

Secuencia del ADNc de ALK1.Fc.5:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGA
CCCAGGGAGACCCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGGCCGCTGGTGACCTGCACGTGTG
AGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGC
TGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTTG
ACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCG
ACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCC
TTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCA
CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGAG (SEC ID N°: 9)

Secuencia de la proteína ALK1.Fc.5:

10

MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVVLV
 REEGRHPQEHRCGCGNLHRELRCGRPTFEVNHYYCCDSHLCNHNVSLLVLEATQPPSEQP
 GTDQGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 10)

Ejemplo 9: El tratamiento con inmunoadhesinas de ALK1 afecta al desarrollo vascular de la retina *in vivo*

Los ratones recibieron inyección i.p. ALK1.Fc, ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 o ALK1.Fc.5 (10 mg/kg de peso corporal) el día 4 postnatal (P4) y P6. El día P8 los ratones se anestesiaron. Se extrajeron los ojos y se fijaron con PFA al 4% en PBS durante una noche, seguido de lavados con PBS. Las retinas diseccionadas se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBST (PBS, Tritón X-100 al 0,5%) durante 3 h, después se incubaron durante una noche con anti-CD31 de rata (1:50, BD Pharmingen) en PBST. Para visualizar el anti-CD31, las retinas se incubaron con AlexaFluor 488 conjugado con anticuerpo anti-rata de cabra (1:400, Molecular Probes) en PBST. Después de terminar la tinción, las retinas se lavaron 4 veces en PBST. Todas las incubaciones nocturnas se realizaron a 4 °C. Se tomaron imágenes de retinas montadas en horizontal mediante microscopía de fluorescencia confocal.

La retina de ratón postnatal temprana desarrolla un patrón vascular estereotípico en una secuencia de eventos bien definida. La vasculatura superficial de la retina se desarrolla como una red en expansión desde la cabeza del nervio óptico, con un brote activo en la periferia y remodelación extensiva del centro. Después, pueden realizarse fácilmente diferentes aspectos del desarrollo de los vasos, por ejemplo, brote de los vasos, remodelación, maduración y especificación arteriovenosa. En las retinas tratadas con inmunoadhesinas de ALK1 (ALK1.Fc, ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 y ALK1.Fc.5), el patrón característico de arterias y venas radialmente alternas se vio mayormente no afectado. Sin embargo, hubo un claro aumento de la densidad vascular, especialmente en los microvasos cercanos a las venas (Fig. 14). Estos resultados indican que los efectos del tratamiento con las inmunoadhesinas de ALK1 adicionales (ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 y ALK1.Fc.5) sobre el desarrollo vascular en la retina de ratón neonatal, son similares a los resultados del tratamiento con ALK1.Fc.

Listado de secuencias

<110> Yan, Minhong

<120> COMPOSICIONES DE QUINASA 1 DE TIPO RECEPTOR DE ACTIVINA Y MÉTODOS DE USO

<130> P4042R1

<150> US 60/986,876

<151> 09-11-2007

<150> US 61/098,557

<151> 19-09-2008

<160> 10

<210> 1

<211> 1059

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 1

atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
 ggtgaccag ggagacctg tgaagccgtc tgggggcccg ctggtgacct 100
 gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
 tgcacagtag tctggtgog ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
 gggctgcggg aacttgaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
 tctgcaacca ctactgctgc gacagccacc totgcaacca caacgtgtcc 300
 ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
 ccagaccggt gtcaccgaca aagctgcgca ctatactctg tgcccaccgt 400
 gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca 450
 aaaccaagg acacctcat gatctccggg acccctgagg tcacatgcgt 500
 ggtggtggcc gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg 550
 tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 600
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga 650
 ctggtgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 700
 cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 750
 ccacaggtgt acacctgcc cccatccggg gaagagatga ccaagaacca 800
 ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg 850

 tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 900
 .cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt 950
 ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc 1000
 atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1050
 ggtaaatga 1059

<210> 2
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada
 <400> 2

ES 2 554 812 T3

Met	Thr	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Met	1	5	10	15
Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	20	25	30	
Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr	35	40	45	
Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	50	55	60	
Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys	Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu	65	70	75	
Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	His	Tyr	Cys	Cys	80	85	90	
Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Ala	95	100	105	
Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Thr	Gly	110	115	120	
Val	Thr	Asp	Lys	Ala	Ala	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	125	130	135	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	140	145	150	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	155	160	165	
Cys	Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	170	175	180	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	185	190	195	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	200	205	210	

ES 2 554 812 T3

Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	215	220	225
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	230	235	240
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	245	250	255
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	260	265	270
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	275	280	285
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	290	295	300
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	305	310	315
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	320	325	330
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	335	340	345
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									350		

<210> 3
 <211> 1051
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 3

atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
 ggtgacccag ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
 gcacgtgtga gageccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
 tgcacagtag tgetggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
 gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
 tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
 ctggtgctgg aggccaccca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
 ccagaccggt gtcaccgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac 400
 ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 450
 gacacctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtga 500
 cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 550

 tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 600
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa 650
 tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc 700
 tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 750
 tacacctgc ccccatcccg ggaagagatg accaagaacc aggtcagcct 800
 gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 850
 agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 900
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag 950
 caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc 1000
 tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1050
 g 1051

<210> 4
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 4

ES 2 554 812 T3

Met	Thr	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Met	1	5	10	15
Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	20	25	30	
Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr	35	40	45	
Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	50	55	60	
Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys	Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu	65	70	75	
Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	His	Tyr	Cys	Cys	80	85	90	
Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Ala	95	100	105	
Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Thr	Gly	110	115	120	
Val	Thr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	125	130	135	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	140	145	150	

Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	155	160	165
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	170	175	180
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	185	190	195
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	200	205	210
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	215	220	225
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	230	235	240
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	245	250	255
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	260	265	270
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	275	280	285
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	290	295	300
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	305	310	315
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	320	325	330
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	335	340	345
Ser Pro Gly Lys																	

<210> 5
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 5

ES 2 554 812 T3

atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
 ggtgaccag ggagaccctg tgaagccgtc tgggggcccg ctggtgacct 100
 gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
 tgcacagtag tctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
 gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
 tctgaacca ctactgctgc gacagccacc tctgaacca caacgtgtcc 300
 ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
 ccagaccgtg gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctgaac 400
 tctgggggg accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc 450
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggccgtgag 500
 ccaggaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 550
 tgcataatgc caagacaaag ccgogggagg agcagtacaa cagcacgtac 600
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 650
 ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 700
 aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 750
 ctgcccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccagggtc gcctgacctg 800
 cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cggcgtggag tgggagagca 850
 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 900
 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 950
 gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 1000
 accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 1044

<210> 6
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada
 <400> 6

ES 2 554 812 T3

Met	Thr	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Met
1				5					10					15
Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro
				20					25					30
Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr
				35					40					45
Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly
				50					55					60
Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys	Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu
				65					70					75
Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	His	Tyr	Cys	Cys
				80					85					90
Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Ala
				95					100					105

Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Thr	Gly	110	115	120
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	125	130	135
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	140	145	150
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	155	160	165
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	170	175	180
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	185	190	195
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	200	205	210
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	215	220	225
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	230	235	240
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	245	250	255
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	260	265	270
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	275	280	285
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	290	295	300
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	305	310	315
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	320	325	330
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	335	340	345

Gly Lys

<210> 7
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 7

ES 2 554 812 T3

atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
 ggtgacccag ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
 gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
 tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
 gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
 tegtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
 ctggtgctgg aggccaccca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
 ccaggagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc ccgtgccag 400
 cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 450
 aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt 500
 ggacgtgagc caggaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggagc 550
 gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 600
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct 650
 gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc 700
 ccacgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag 750
 gtgtacaccc tgccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag 800
 cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt 850
 gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 900
 ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa 950
 gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg 1000
 ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1050
 tga 1053

<210> 8
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 8

ES 2 554 812 T3

Met	Thr	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Met
1				5					10					15
Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro
				20					25					30
Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr
				35					40					45

Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	50	55	60
Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys	Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu	65	70	75
Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	His	Tyr	Cys	Cys	80	85	90
Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Ala	95	100	105
Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Glu	Pro	110	115	120
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	125	130	135
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	140	145	150
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	155	160	165
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	170	175	180
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	185	190	195
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	200	205	210
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	215	220	225
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	230	235	240
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	245	250	255
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	260	265	270
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	275	280	285
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	290	295	300
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	305	310	315
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	320	325	330
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	335	340	345

Leu Ser Pro Gly Lys
350

<210> 9
<211> 1054
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 9

```

atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
ggtagaccag ggagacctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
gcacgtgtga gagcccatat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
tgcacagtag tgctgggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
gggctgcggg aacttgacac gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
ctggtgctgg aggccaccca acctccttcg gagcagcccg gaacagatgg 350
ccaggagccc aaatcttctg aaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag 400
cacctgaact cctgggggga ccgtcagttc tctcttccc cccaaaaccc 450
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgg 500
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg 550
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 600
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct 650
gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc 700
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 750
gtgtacaccc tgccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggctcag 800
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt 850
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 900
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa 950
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg 1000
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa 1050
tgag 1054

```

<210> 10
<211> 350
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 10

Met	Thr	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Met	1	5	10	15
Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	20	25	30	
Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr	35	40	45	
Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	50	55	60	
Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys	Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu	65	70	75	
Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	His	Tyr	Cys	Cys	80	85	90	
Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Ala	95	100	105	
Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Glu	Pro	110	115	120	
Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	125	130	135	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	140	145	150	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	155	160	165	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	170	175	180	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	185	190	195	
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	200	205	210	
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	215	220	225	
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	230	235	240	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	245	250	255	
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	260	265	270	
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	275	280	285	

ES 2 554 812 T3

Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
				290					295					300
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				305					310					315
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
				320					325					330
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
				335					340					345
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				350										

REIVINDICACIONES

1. Una inmunoadhesina de ALK-1 para su uso en la inhibición de la linfangiogénesis en un método de tratamiento de una afección patológica asociada con la linfangiogénesis, seleccionada de cáncer, metástasis tumoral o cancerosa, trastorno proliferativo celular, degeneración macular, enfermedad inflamatoria, artritis reumatoide, retinopatía diabética y soriasis, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de inmunoadhesina de ALK-1, mediante lo cual se inhibe la linfangiogénesis y comprendiendo la inmunoadhesina de ALK-1 los restos de aminoácido 22-352 de la SEC ID N°: 2, los restos 22-349 de la SEC ID N°: 4, los restos 22-347 de la SEC ID N°: 6, los restos 22-350 de la SEC ID N°: 8 o los restos 22-350 de la SEC ID N°: 10.
2. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según la reivindicación 1, donde la organización de los pericitos está alterada en el sujeto.
3. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, donde la afección patológica es un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular.
4. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, donde el sujeto ha desarrollado una metástasis tumoral o corre el riesgo de desarrollarla..
5. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según la reivindicación 4, donde dicha metástasis tumoral está presente en el sistema linfático o en un órgano distante.
6. Una inmunoadhesina de ALK-1 para su uso en un método de inhibición de crecimiento tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una inmunoadhesina de ALK-1, mediante lo cual se inhibe el crecimiento tumoral, comprendiendo la inmunoadhesina de ALK-1 los restos de aminoácido 22-352 de la SEC ID N°: 2, los restos 22-349 de la SEC ID N°: 4, los restos 22-347 de la SEC ID N°: 6, los restos 22-350 de la SEC ID N°: 8 o los restos 22-350 de la SEC ID N°: 10
7. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según las reivindicaciones 3 o 6, donde el tumor, el cáncer o el trastorno proliferativo celular son carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.
8. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según las reivindicaciones 3 o 6, donde el procedimiento comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénesis.
9. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según la reivindicación 8, donde el agente antiangiogénesis es un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), donde, opcionalmente, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF y donde, opcionalmente, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
10. La inmunoadhesina de ALK-1 para su uso según las reivindicaciones 3 o 6, donde el procedimiento comprende adicionalmente la administración de una cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos.
11. Una composición que comprende una inmunoadhesina de ALK-1, que comprende los restos de aminoácido 22-352 de la SEC ID N°: 2, los restos 22-349 de la SEC ID N°: 4, los restos 22-347 de la SEC ID N°: 6, los restos 22-350 de la SEC ID N°: 8 o los restos 22-350 de la SEC ID N°: 10 y un vehículo farmacéutico para su uso en la inhibición de la linfangiogénesis en un método de tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular.

ALK1.Fc

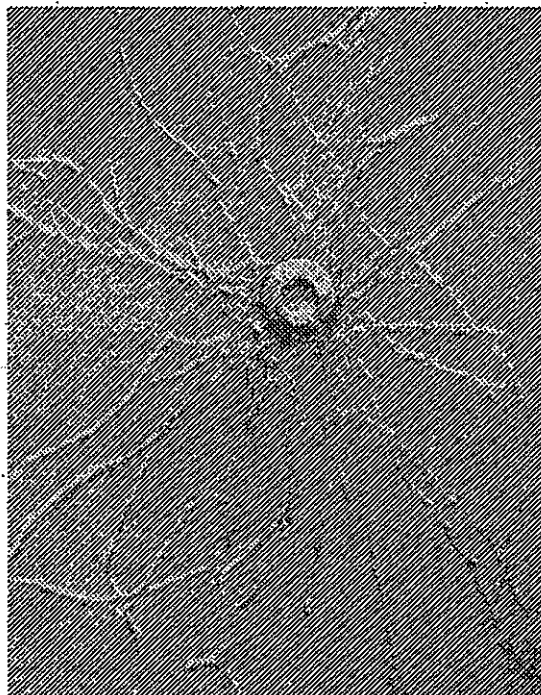


FIG. 1B

Control

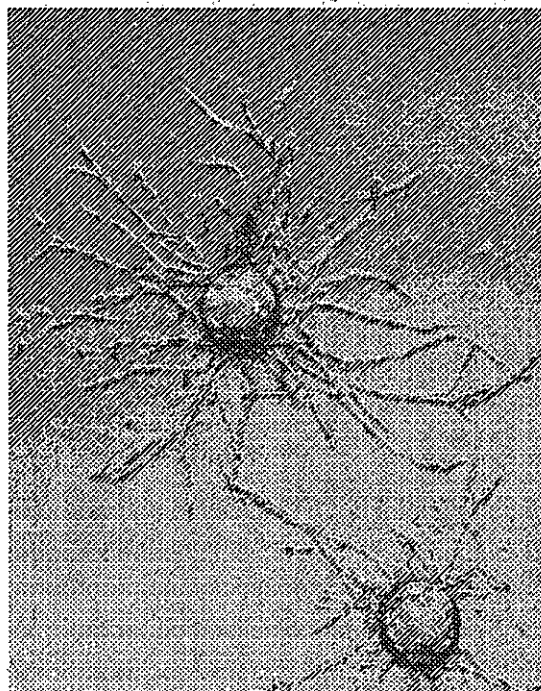


FIG. 1A

FIG. 2A

Lectina -FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

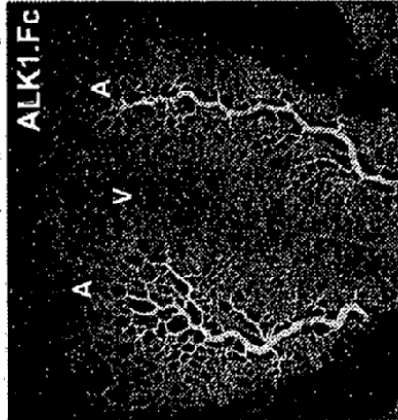


FIG. 2B

CD31 +Lectina - FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

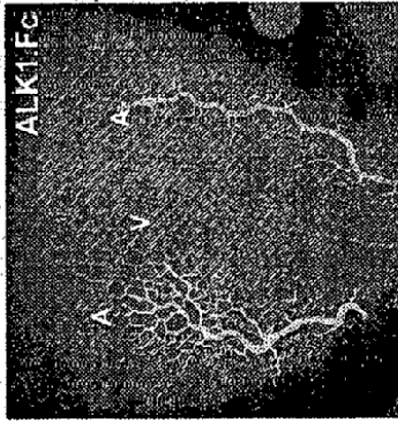
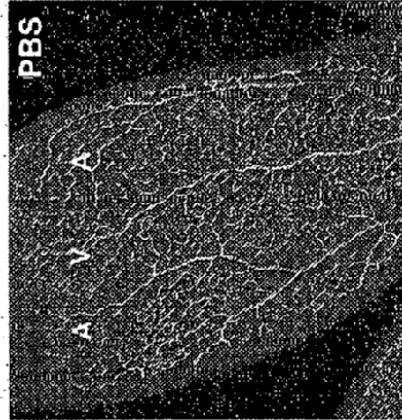
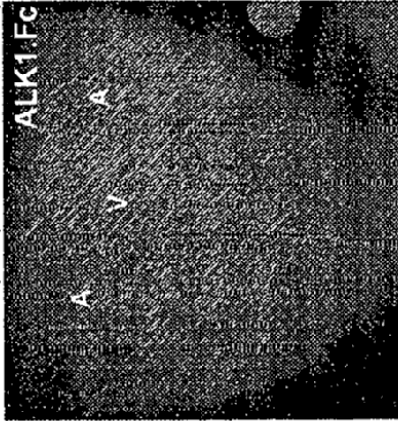


FIG. 2C

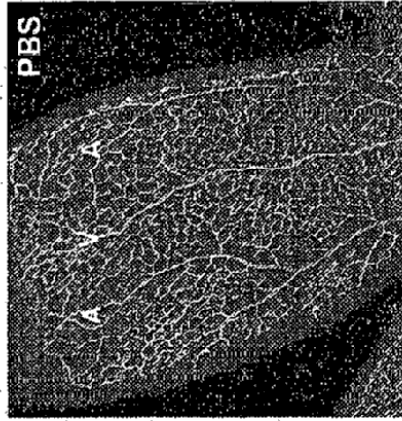
CD31

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



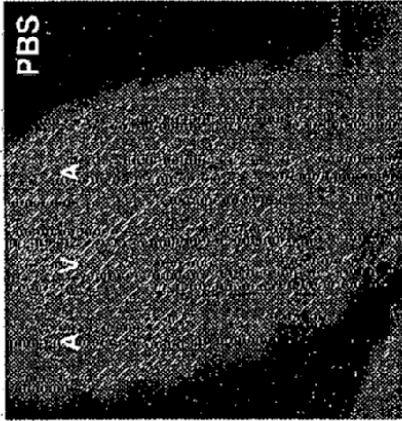
Lectina -FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



CD31 + Lectina-FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



CD31

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

FIG. 2D

FIG. 2E

FIG. 2F

FIG. 3A **FIG. 3B** **FIG. 3C**

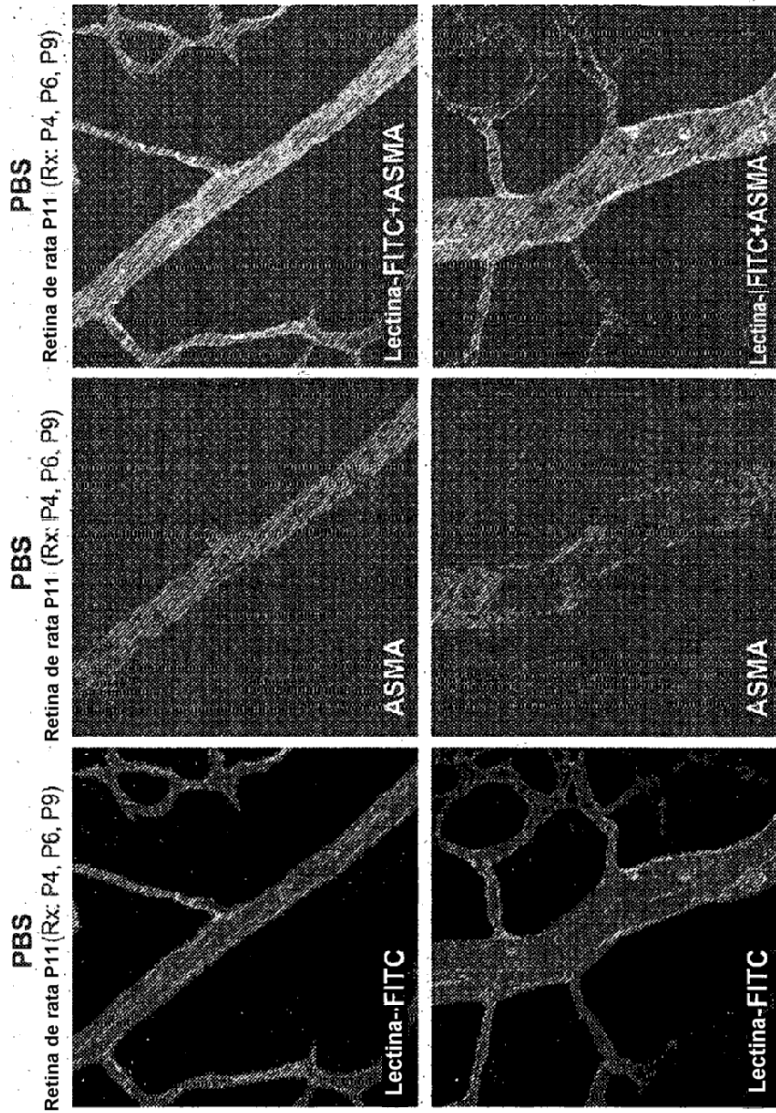


FIG. 3D **FIG. 3E** **FIG. 3F**

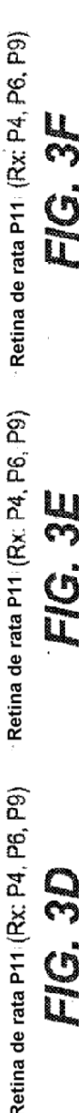


FIG. 4A

PBS

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

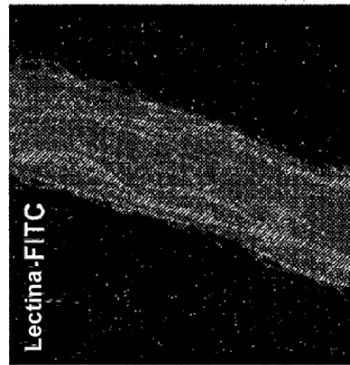


FIG. 4B

PBS

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

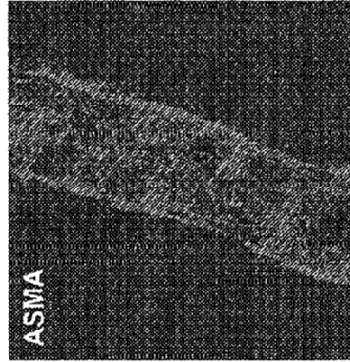


FIG. 4C

PBS

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



FIG. 4D

ALK-Fc

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

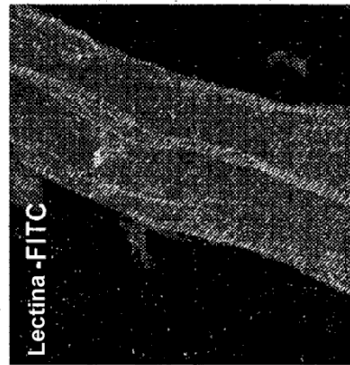


FIG. 4E

ALK-Fc

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

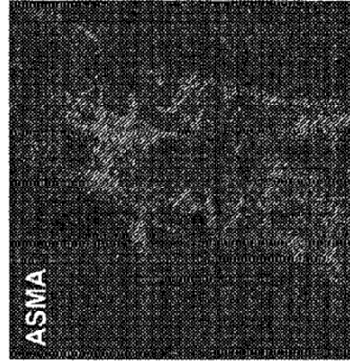
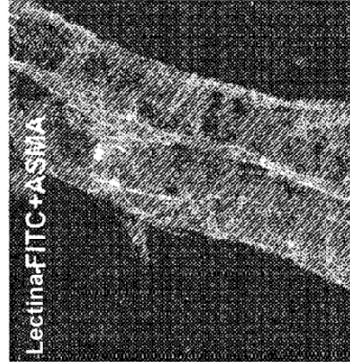


FIG. 4F

ALK-Fc

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



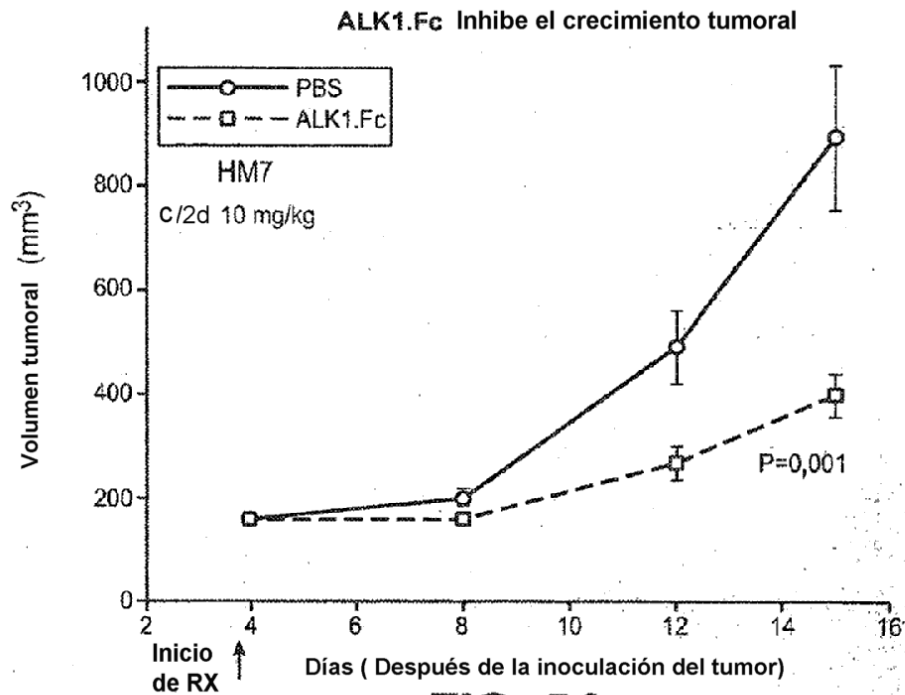


FIG. 5A

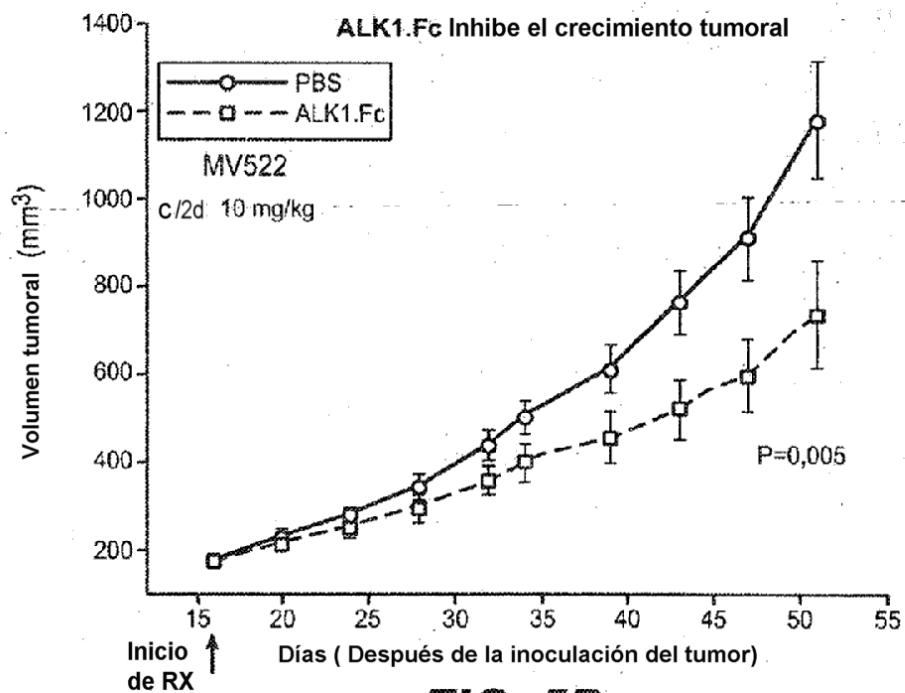


FIG. 5B

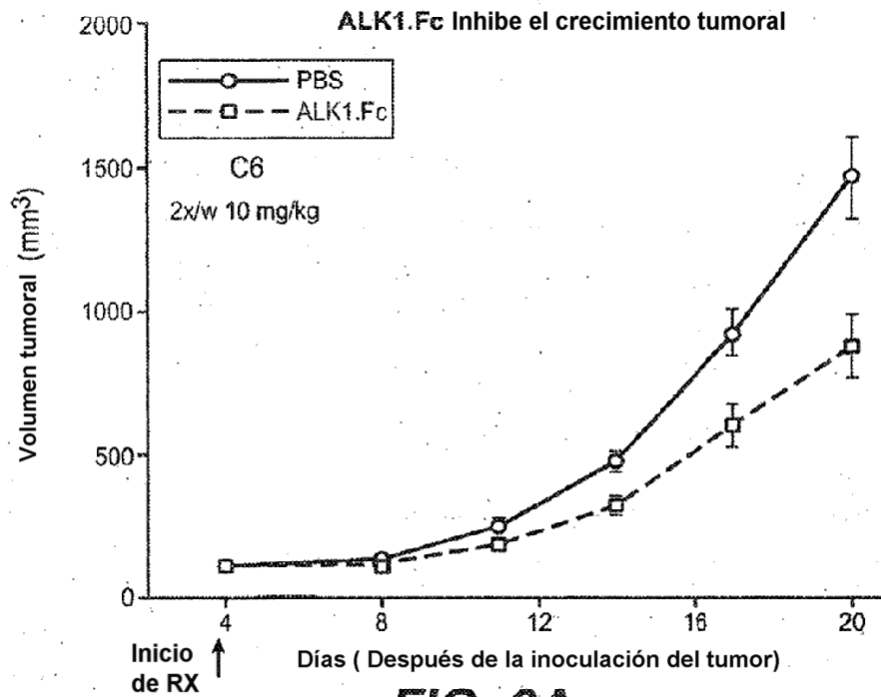


FIG. 6A

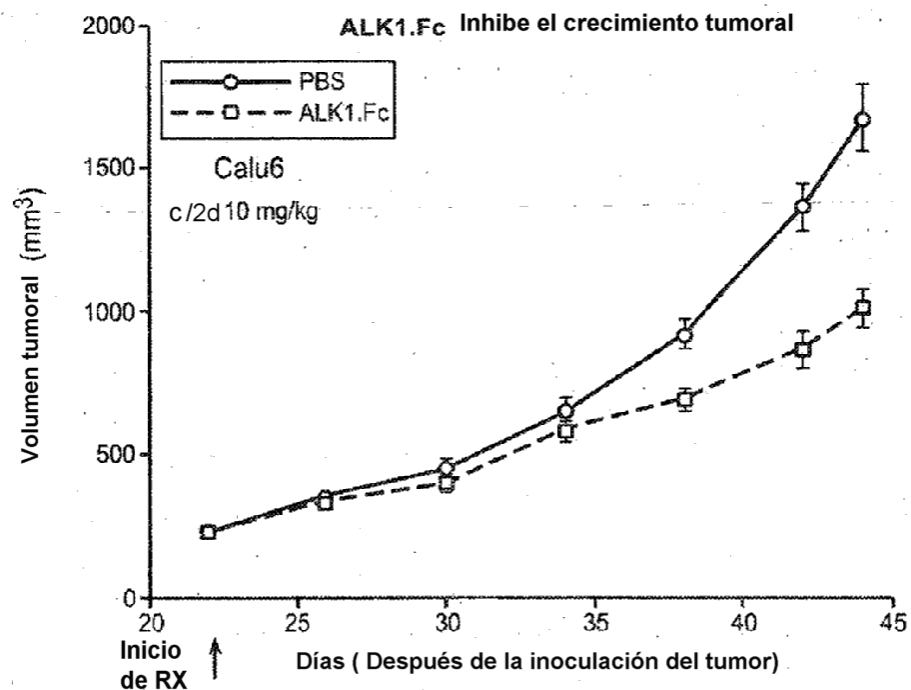


FIG. 6B

ALK1.Fc Tiene actividad anti-tumoral aditiva en combinación con anti-VEGF

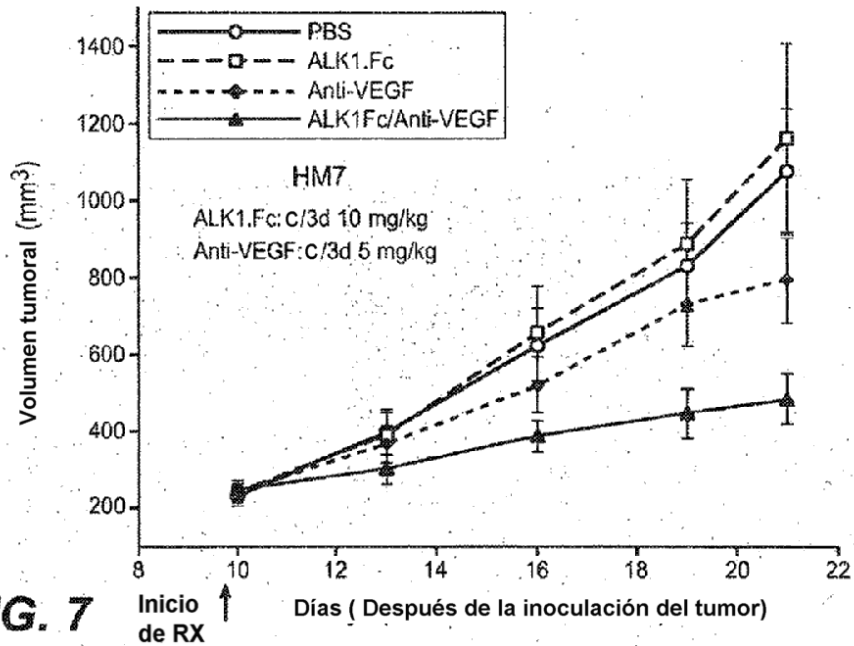


FIG. 7

ALK1.Fc Tiene actividad anti-tumoral aditiva en combinación con anti-VEGF

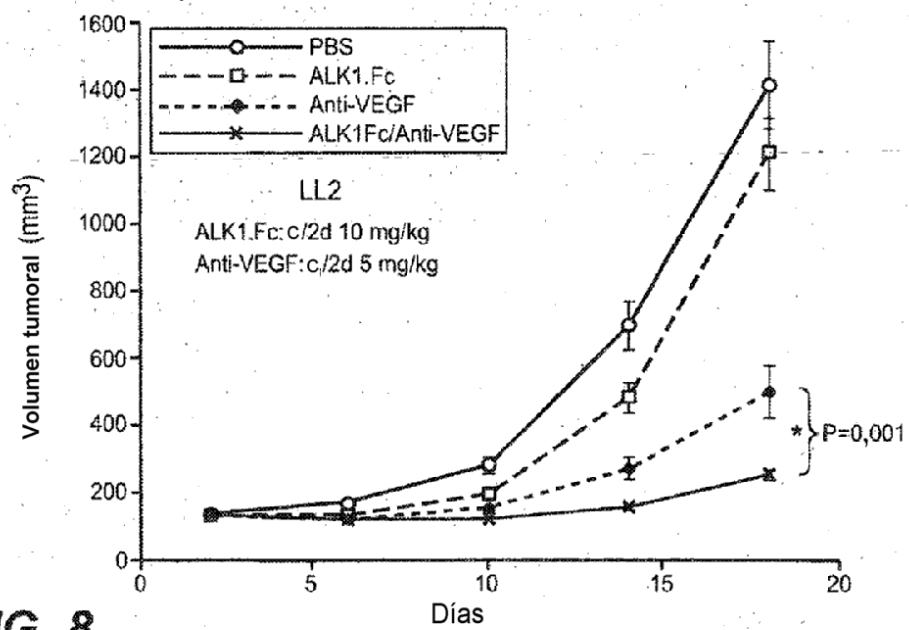
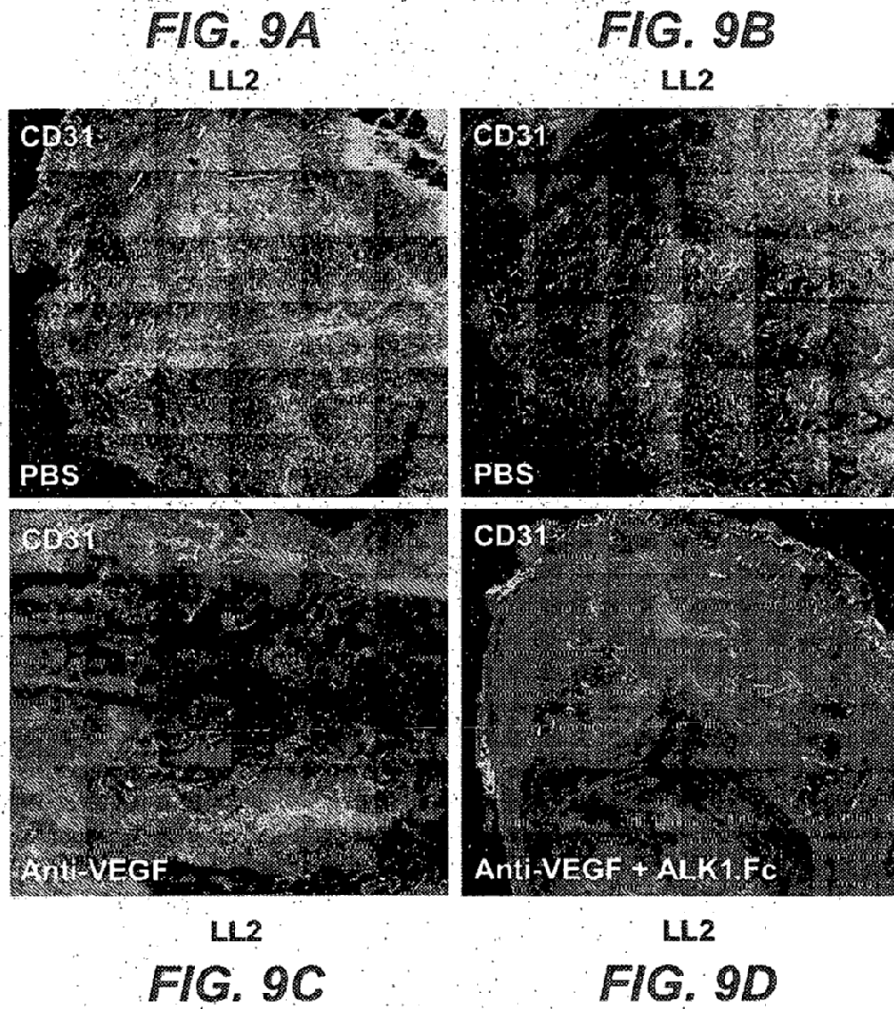
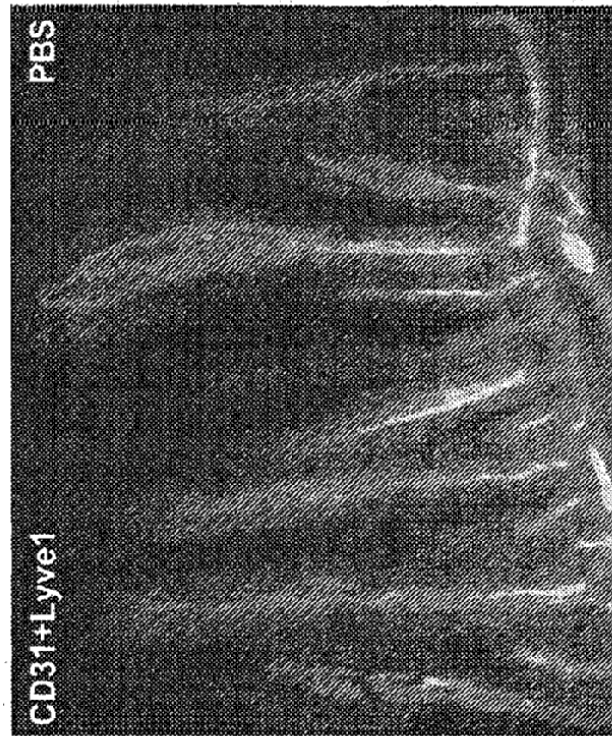


FIG. 8

La combinación de ALK1.Fc con Anti-VEGF causa una reducción drástica de la densidad vascular tumoral.

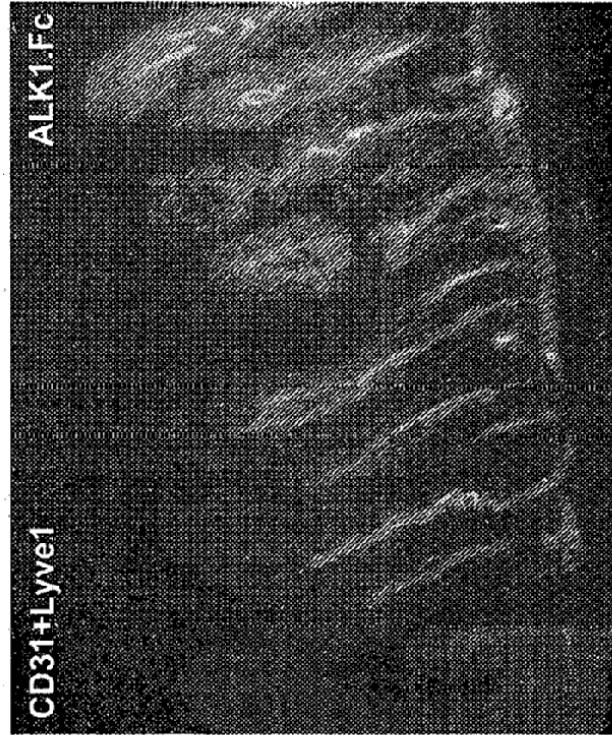


ALK1.Fc Influye en el desarrollo postnatal temprano de capilares linfáticos a lo largo de las vellosidades intestinales del ratón.



Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

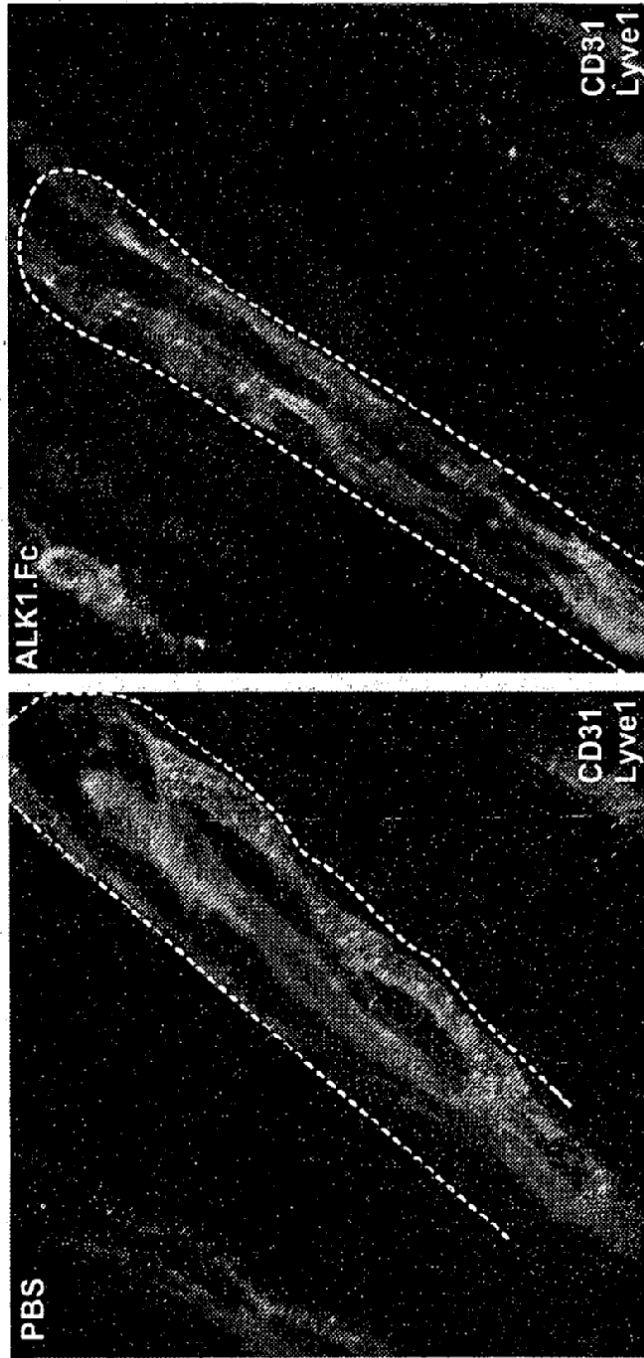
FIG. 10A



Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 10B

ALK1.Fc Infiuye en el desarrollo postnatal temprano de capilares linfáticos a lo largo de las vellosidades intestinales del ratón



Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 11A

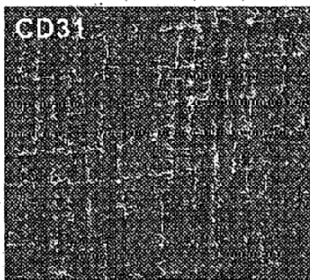
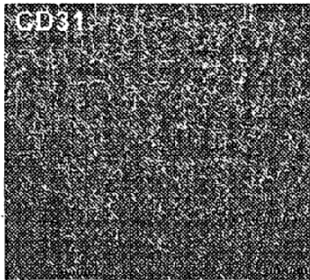
Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 11B

ALK1.Fc influye en el desarrollo postnatal temprano de la vasculatura linfática en la piel de la cola del ratón.

FIG. 12A

Piel de la cola del ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)
PBS



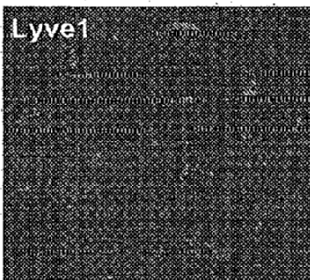
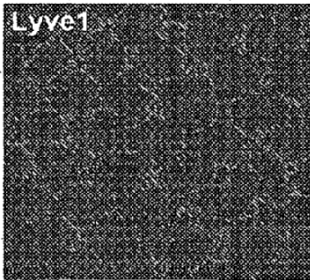
ALK1.Fc

Piel de la cola del ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 12D

FIG. 12B

Piel de la cola del ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)
PBS



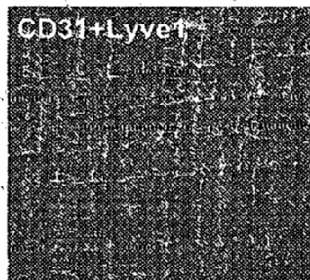
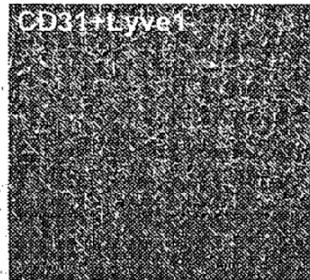
ALK1.Fc

Piel de la cola del ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 12E

FIG. 12C

Piel de la cola del ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)
PBS



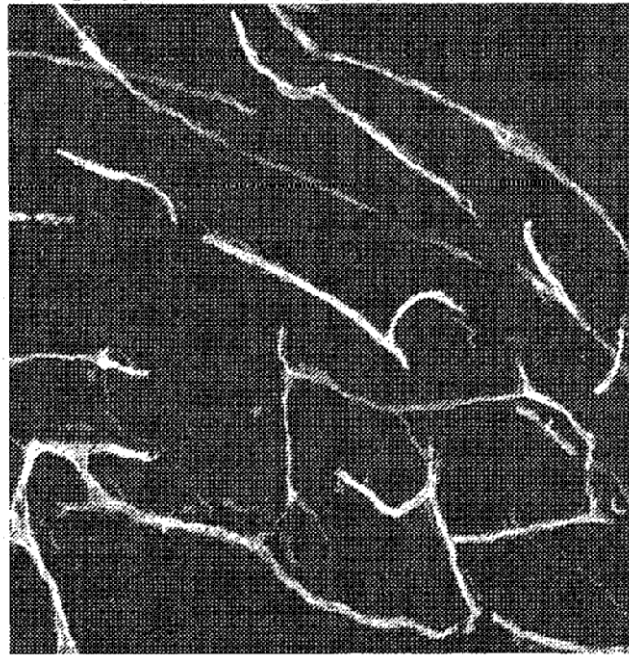
ALK1.Fc

Piel de la cola del ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 12F

Los vasos tumorales tratados con ALK1.Fc tienen pericitos mal organizados y separados.

Control



Meca32+CD105+Desmina
TIB68

FIG. 13A

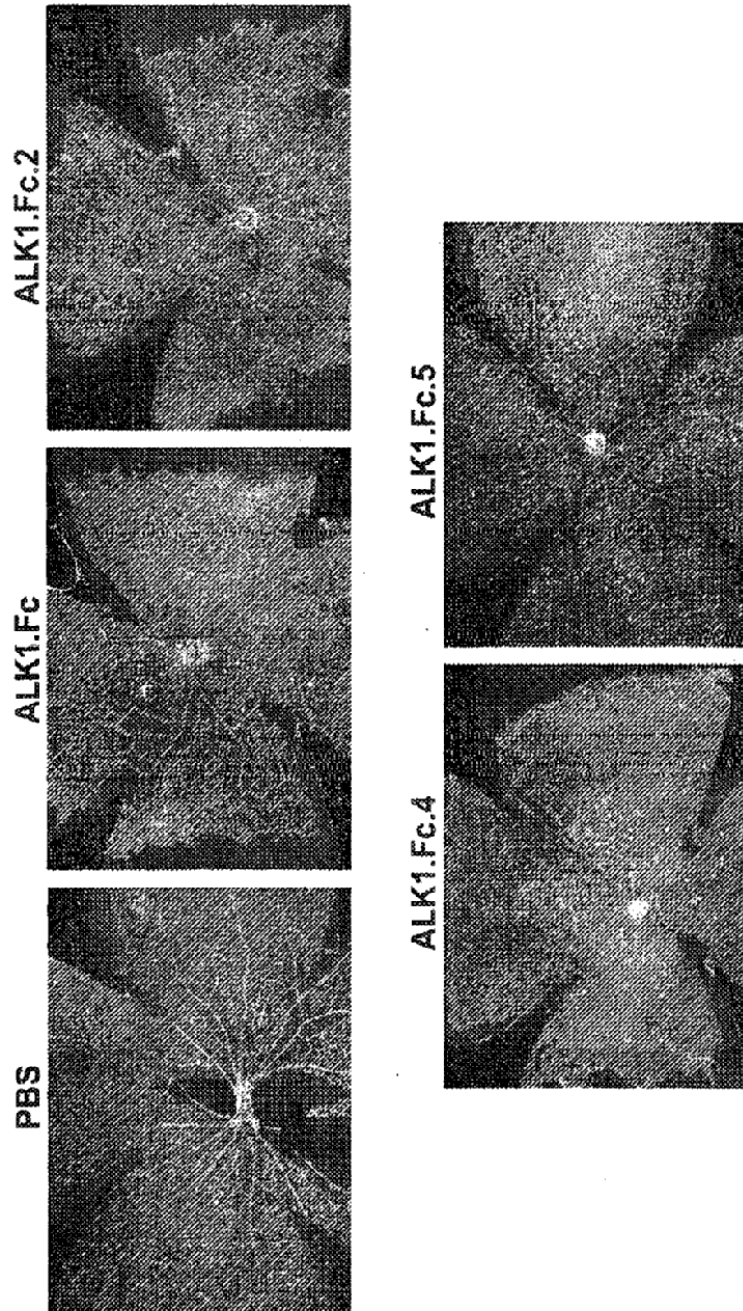
ALK1.Fc



Meca32+CD105+Desmina
TIB68

FIG. 13B

Las inmunoadhesinas de ALK-1 influyen en el desarrollo vascular de la retina en ratones neonatales



Retina de ratón P8 (Rx: P4, P6) teñida con CD31

FIG. 14