

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 208**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10757138 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2509626**

54 Título: **Anticuerpos anti-VEGF-C y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**11.12.2009 US 285910 P**

**23.12.2009 US 284753 P**

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

**01.04.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BAGRI, ANIL D.;**

**FUH, GERMAINE y**

**LEE, CHINGWEI V.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 565 208 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-VEGF-C y métodos de uso de los mismos.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a antagonistas de VEGF-C, especialmente a anticuerpos anti-VEGF-C y a su uso en la prevención y en el tratamiento de la progresión tumoral.

## 10 Antecedentes

El desarrollo de un sistema vascular es un requisito fundamental en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos que se desarrollan de manera activa, tales como los embriones y los 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 acontecimiento biológico complejo pero organizado, en el que intervienen 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 de tipo cordón; c) después, los cordones vasculares experimentan tubulogénesis para formar vasos con un lumen central d) los cordones o vasos existentes producen brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelación y formación adicionales; y f) las células peri-endoteliales se acumulan para revestir los túbulos endoteliales, proporcionando funciones de mantenimiento y moduladoras a los vasos; dichas células incluyen, pericitos para capilares pequeños, células de la musculatura lisa para vasos más grandes y células miocárdicas en el corazón. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3: 513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *Cell*. 112: 19-28 (2003).

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

En el caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar nutrientes para el crecimiento y la metástasis del tumor. Folkman *et al.*, *Nature* 339: 58 (1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Normalmente un tumor comienza como una sola célula aberrante que puede proliferar solamente a un tamaño de algunos milímetros cúbicos debido a la distancia desde los lechos capilares disponibles, y este puede permanecer 'inactivo' sin crecimiento ni diseminación adicional durante un periodo de tiempo prolongado. Algunas células tumorales se transforman después al fenotipo angiogénico para activar a las células endoteliales, que proliferan y maduran en 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, se ha observado una correlación entre la densidad de los microvasos en secciones tumorales y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en diversos otros tumores. 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 interruptor angiogénico no se entiende bien, pero se piensa que la neovascularización de la masa tumoral es el resultado del saldo neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman *Nat Med* 1 (1): 27-31 (1995)).

En la actualidad se acepta que las metástasis son responsables de la inmensa mayoría de las muertes producidas por tumores sólidos, con una estimación del 90 % (Gupta y Massague, *Cell* 127, 679-695 (2006)). El proceso complejo 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 vasos linfáticos o sanguíneos y la extravasación y el crecimiento de células tumorales en sitios secundarios. Los análisis de nódulos linfáticos regionales en muchos tipos de tumor sugieren 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 nódulos linfáticos es un importante factor de pronóstico adverso. Aunque anteriormente se pensaba que dichas metástasis implicaban exclusivamente el paso de células malignas a lo largo de los vasos linfáticos existentes cerca de los tumores, recientes estudios experimentales e informes clínicopatológicos (revisados en Achen *et al.*, *Br J Cancer* 94 (2006), 1355-1360 y en Nathanson, *Cancer* 98, 413-423 (2003)) sugieren que los tumores sólidos pueden inducir la linfangiogénesis y promover la propagación del tumor. Estos estudios y otros recientes sugieren que la actuación sobre los vasos linfáticos y sobre la linfangiogénesis podría ser una estrategia terapéutica útil para restringir el desarrollo de metástasis cancerosas, lo que tendría un beneficio significativo para muchos pacientes.

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

A la vista del papel de la angiogénesis y linfangiogénesis en muchas enfermedades y trastornos, es deseable tener un medio de modulación de uno o más de los efectos biológicos que causan estos procesos. Está claro que, a pesar del avance significativo en el tratamiento del cáncer conseguido por inhibidores de la angiogénesis, tales como bevacizumab, aún se están investigando terapias mejoradas, especialmente aquellas que potencian adicionalmente la eficacia global. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

Shibata *et al.* desvelan una terapia de combinación que se dirige tanto a VEGF-C como a VEGF-A.

#### Sumario de la invención

La invención proporciona nuevos anticuerpos anti-VEGF-C y usos de los mismos. La presente invención se basa, al menos en parte, en resultados experimentales obtenidos con anticuerpos anti-VEGF-C. Los resultados obtenidos indican que VEGF-C desempeña una función en la angiogénesis, así como en la modulación de la migración y proliferación de células endoteliales linfáticas (CEL) mediada por VEGF-C. Además, los resultados demuestran que el bloqueo de VEGF-C conduce a una inhibición de la linfangiogénesis y a una reducción en la metástasis en nódulos linfáticos y en órganos distales. Por consiguiente, un antagonista de VEGF-C, tal como los anticuerpos anti VEGF-C de la invención, como se describe en el presente documento, proporciona agentes de diagnóstico y terapéutico importantes para su uso actuando sobre afecciones patológicas asociadas con la activación de los receptores de VEGF-C.

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

- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3;
- (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8;
- (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26;
- (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27;
- (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; y
- (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF-C o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti-VEGF-C comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF-C o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti-VEGF-C comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF-C o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti-VEGF-C comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF-C o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti-VEGF-C comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, y un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85.

En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF-C o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende una sustitución de aminoácido en la posición 297 en alanina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento comprenden adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 265 en alanina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento comprenden adicionalmente sustituciones de aminoácidos en las posiciones 265 en alanina y en la posición 297 en alanina.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>. En determinadas realizaciones, el anticuerpo está humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es humano. En determinadas realizaciones, al menos una parte de la secuencia marco conservada es una secuencia marco conservada consenso humana.

- En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C es un anticuerpo biespecífico. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF-C y a otro antígeno. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF-C y a VEGF. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico puede unirse a dos epítomos diferentes de VEGF-C. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada comprendido en una, dos o tres secuencias de región hipervariable, HVR, pesada variable de la invención. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada que, al igual que los anticuerpos anti-VEGF-C de la invención, se une al mismo epítomo en VEGF-C.
- En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos VC4.5, y fragmentos y variantes, tales como variantes de los mismos maduras por afinidad.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo anti-VEGF-C que comprende la secuencia de la región variable de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en VC4.5, y sus fragmentos y variantes.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo anti-VEGF-C que comprende las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de VC4.5, o un fragmento o variante del mismo. En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo anti-VEGF-C que comprende las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de VC4.5, o un fragmento o variante del mismo.
- En un aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una realización, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En una realización, se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector. En una realización, la célula hospedadora es eucariota. En una realización, la célula hospedadora es una célula CHO. En una realización, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo anti-VEGF-C, en el que el método comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo y aislar el anticuerpo.
- En un aspecto, se proporciona un método de detección de la presencia de VEGF-C en una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de la invención en condiciones que permitan la unión del anticuerpo con VEGF-C, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y VEGF-C.
- En un aspecto, se proporciona un método para identificar a un paciente con un trastorno asociado con la expresión de VEGF-C, comprendiendo el método poner en contacto una muestra biológica del paciente, que tiene el trastorno, o que se sospecha que lo tiene, con un anticuerpo de la invención y detectar el complejo VEGF-C - anticuerpo anti-VEGF-C en la muestra biológica, en el que la detección del complejo VEGF-C - anticuerpo anti-VEGF-C indica que el paciente tiene un trastorno asociado con la expresión de VEGF-C. En otra realización más, el anticuerpo anti-VEGF-C se marca de manera detectable.
- Adicionalmente la invención proporciona inmunocnjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente, tal como un fármaco o un agente citotóxico.
- En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la migración de células endoteliales linfáticas, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales linfáticas, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la permeabilidad vascular, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la linfangiogénesis tumoral, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la metástasis tumoral, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se describen métodos para tratar un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En una realización, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF. En una realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF-C. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
- En una realización, se proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En otra realización, se proporcionan métodos para inhibir la migración de células endoteliales linfáticas, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los

- anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En otra realización, se proporcionan métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales linfáticas, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En otra realización, se proporcionan métodos para inhibir la permeabilidad vascular, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En otra realización adicional, se proporcionan métodos para inhibir la linfangiogénesis tumoral, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En otra realización, se proporcionan métodos para inhibir la metástasis tumoral, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En otra realización, se proporcionan métodos para el tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento y una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico.
- En determinadas realizaciones, el sujeto es un paciente humano, tal como un paciente humano con cáncer, al que se le ha diagnosticado desarrollo de metástasis, o que puede correr el riesgo de desarrollarla. En determinadas realizaciones, el sujeto es reincidente o insensible a un antagonista de VEGF.
- En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia.
- En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer estromal 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 o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanomas nodulares, linfoma de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPP), proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema asociado con tumores cerebrales y síndrome de Meigs.
- En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer pulmonar no microcítico, cáncer renal, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon o cáncer colorrectal.
- En determinadas realizaciones, el linfoma de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH) de grado bajo/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH con enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom.
- En una realización, se proporciona un método de potenciación de la eficacia de un agente anti-angiogénico en un sujeto que tiene una afección patológica asociada con la angiogénesis, que comprende administrar al sujeto, además del agente antiangiogénico, una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anteriores, por lo cual se potencia dicha eficacia del agente antiangiogénico. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, la afección patológica asociada con angiogénesis es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, la afección patológica asociada con la angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular. En una realización, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF. En una realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
- En otro aspecto, la invención también se refiere a una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C anterior en mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de metástasis tumoral que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento en mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable.
- En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer, en los que el método comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos que comprenden adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo anti-VEGF-C. Una lista ejemplar y no limitante de cánceres contemplados se proporciona en el presente documento en el apartado de "definiciones".

5 En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de un tumor, cáncer o trastorno proliferativo celular en un sujeto refractario a o que ha remitido de una terapia con antagonista de VEGF que comprende la etapa de administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento solos o en combinación con el antagonista de VEGF. En determinadas realizaciones, los sujetos  
10 previamente se han tratado con anticuerpo anti-VEGF. En determinadas realización, los tumores son no respondedores o refractarios a terapia con anticuerpo anti-VEGF.

10 En determinadas realizaciones, la invención se refiere a anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento para su uso en la prevención o el tratamiento de metástasis tumoral.

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de prevención de la recurrencia de cáncer en el sujeto que comprenden administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento, en el que la administración impide la recurrencia del cáncer en el sujeto. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir la probabilidad de recurrencia de cáncer en un sujeto que comprenden  
20 administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento, en el que la administración reduce la probabilidad de recurrencia del cáncer en el sujeto. En determinadas realizaciones, la administración de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento impide o reduce la probabilidad de reocurrencia de un tumor clínicamente detectable, o su metástasis. En determinadas realizaciones, los métodos de prevención del recrecimiento de un tumor en un sujeto comprenden las etapas de extirpar el tumor y después de esto administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de prevención de la recurrencia del cáncer en un sujeto que tiene un tumor que comprende las etapas de extraer el tumor y después de esto administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento.

25 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF-C descritos en el presente documento bloquean la actividad biológica de VEGF-C. En determinadas realizaciones, el VEGF-C es el VEGF-C de longitud completa. En otra realización, el VEGF-C es el VEGF-C maduro.

30 En determinadas realizaciones, los métodos descritos anteriormente comprenden adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. En determinadas realizaciones, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF. En determinadas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

35 En determinadas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos anteriormente comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico. Una lista ejemplar y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona en el presente documento en el apartado "definiciones". En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, cisplatino, gemcitabina y pemetrexed.

40 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF se administra primero al sujeto y después se administra el anticuerpo anti-VEGF-C al sujeto. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C y el anticuerpo anti-VEGF se administran simultáneamente al sujeto. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C, el anticuerpo anti-VEGF y el agente quimioterapéutico se administran simultáneamente al sujeto.

45 Cualquier realización descrita en el presente documento o cualquier combinación de la misma se aplica a cualquiera y a todos los anticuerpos anti-VEGF-C y a los métodos de la invención descritos en el presente documento.

#### Breve descripción de los dibujos

50 Figura 1A-F: secuencias bucle de la región hipervariable, HVR, de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti-VEGF-C. Las Figuras muestran las secuencias de la HVR de cadena pesada, H1, H2, y H3, y las secuencias de la HVR de cadena ligera, L1, L2 y L3. La numeración de secuencias es la siguiente: clon VC1 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:9; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.1 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR- H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:10; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.2 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:11; HVR- L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.3 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:12; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR- L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.4 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:13; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR- L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.5 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:14; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.6 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:15; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.7 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:16; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.8 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:17; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.9 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-

H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:18; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR- L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.10 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:19; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.11 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:5; HVR-H3 es SEQ ID NO:20; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.12 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC1.12.1 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:30); clon VC1.12.2 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR- L3 es SEQ ID NO:31); clon VC1.12.3 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:32); clon VC1.12.4 (HVR- H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:33); clon VC1.12.5 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:34); clon VC1.12.6 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:35); VC1.12.8 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:36); clon VC1.12.9 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:37); clon VC1.12.10 (HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR- H2 es SEQ ID NO:6; HVR-H3 es SEQ ID NO:21; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:38); clon VC3 (HVR-H1 es SEQ ID NO:2; HVR-H2 es SEQ ID NO:7; HVR-H3 es SEQ ID NO:22; HVR- L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC4 (HVR-H1 es SEQ ID NO:3; HVR- H2 es SEQ ID NO:8; HVR-H3 es SEQ ID NO:23; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR- L3 es SEQ ID NO:29); clon VC4.2 (HVR-H1 es SEQ ID NO:3; HVR-H2 es SEQ ID NO:8; HVR-H3 es SEQ ID NO:24; HVR- L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); clon VC4.3 (HVR-H1 es SEQ ID NO:4; HVR-H2 es SEQ ID NO:91; HVR-H3 es SEQ ID NO:23; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR- L3 es SEQ ID NO:39); clon VC4.4 (HVR-H1 es SEQ ID NO:3; HVR-H2 es SEQ ID NO:8; HVR-H3 es SEQ ID NO:25; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29); and clon VC4.5 (HVR- H1 es SEQ ID NO:3; HVR-H2 es SEQ ID NO:8; HVR-H3 es SEQ ID NO:26; HVR-L1 es SEQ ID NO:27; HVR-L2 es SEQ ID NO:28; HVR-L3 es SEQ ID NO:29).

Las posiciones de aminoácidos se enumeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como de describe más adelante.

Las Figuras 2A y 2B representan secuencias marco conservadas consenso humanas aceptadas ejemplares para su uso en la realización práctica de la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

#### Regiones marco conservadas consenso de la región variable de cadena pesada (VH)

región marco conservada consenso subgrupo I VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:40)  
 región marco conservada consenso subgrupo I VH humana menos las regiones hipervariables ampliadas (SEQ ID NO:41-43)  
 región marco conservada consenso subgrupo II VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:44)  
 región marco conservada consenso subgrupo II VH humana menos regiones las hipervariables ampliadas (SEQ ID NO:45-47)  
 región marco conservada consenso subgrupo II VH humana menos las ampliadas  
 región marco conservada consenso subgrupo III VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:48)  
 región marco conservada consenso subgrupo III VH humana menos las regiones hipervariables ampliadas (SEQ ID NO:49-51)  
 región marco conservada aceptora VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:52)  
 región marco conservada aceptora VH humana menos las regiones hipervariables ampliadas (SEQ ID NO:53-54)  
 región marco conservada 2 aceptora VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:55)  
 región marco conservada 2 aceptora VH humana menos las regiones hipervariables ampliadas (SEQ ID NO:56-58)

Las posiciones de aminoácido se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe más adelante.

La Figura 3 representa secuencias de la región marco conservada consenso humanas aceptoras ejemplares para su uso en la realización práctica de la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

#### Regiones marco conservadas consenso de la región variable de cadena ligera (VL)

región marco conservada consenso subgrupo I VL kappa humana (SEQ ID NO:59)  
 región marco conservada consenso subgrupo II VL kappa humana (SEQ ID NO:60)  
 región marco conservada consenso subgrupo III VL kappa humana (SEQ ID NO:61)  
 región marco conservada consenso subgrupo IV VL kappa humana (SEQ ID NO:62)  
 La Figura 4 representa secuencias de la región marco conservada de las cadenas pesada y ligera de huMAb4D5-8.  
 Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

La Figura 5 representa secuencias de la región marco conservada modificadas/variantes de las cadenas pesada y ligera de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

Figura 6: A. Esquema del dominio de homología de VEGF (VHD) que incluye VEGF. B. Interacciones de ligando con receptor de la familia de factores de crecimiento de VEGF.

Figura 7: el anticuerpo anti VEGF-C reduce la migración celular inducida por VEGF-C *in vitro*. A. Las células endoteliales linfáticas (CEL) migran en respuesta a 200 ng/ml de VEGF-C maduro (R&D Systems) durante 18 horas en presencia o en ausencia de anti-VEGF-C (10 µg/ml) (n= 6 para cada condición). B. Las CEL migran en respuesta a 200 ng/ml de VEGF-C de longitud completa durante 18 horas en presencia o en ausencia de anti-VEGF-C (10 µg/ml) (n= 6 para cada condición). Las barras de error representan el Error Típico de la Media (ETM). \* $p < 0,05$ .

Figura 8: el anticuerpo anti VEGF-C reduce la proliferación celular inducida por VEGF-C *in vitro*. A. Las CEL proliferan en respuesta a 200 ng/ml de VEGF-C maduro (R&D Systems) en presencia o en ausencia de anti-VEGF-C (1 µg/ml) (n= 6 para cada condición). B. Las CEL proliferan en respuesta a 200 ng/ml VEGF-C de longitud completa en presencia o en ausencia de anticuerpo anti-VEGF-C (1 µg/ml) (n= 6 para cada condición). Las barras de error representan el ETM. \* $p < 0,05$ .

Figura 9: el anticuerpo anti VEGF-C reduce la germinación inducida por VEGF-C *in vitro*. Las CEL germinan en un ensayo de germinación con perlas perla en respuesta a 200 ng/ml de VEGF-C maduro (R&D Systems) durante 14 días en presencia o en ausencia de anticuerpo anti-VEGF-C (10 µg/ml). Los cultivos se tiñeron con anticuerpo anti-YVE-1 para visualizar las CEL (se muestran imágenes representativas).

Figura 10: El anticuerpo anti-VEGF-C VC4.5 bloquea la unión de VEGF-C con VEGFR3. El receptor bloquea actividades comparando el anticuerpo anti-VEGF-C VC4.5 como una forma de IgG2a murina o IgG1 humana. Una concentración fija de VEGF-C conjugado con biotina se incubó con diluciones en serie del anticuerpo anti-VEGF-C mVC4.5 (mIgG2a) y del anticuerpo anti-VEGF-C hVC4.5 (hIgG1) durante 2 horas. Después el VEGF-C no unido se capturó mediante VEGFR3-Fc inmovilizado y se detectó con conjugado de estreptavidina-HRP.

Figura 11: El anticuerpo anti-VEGF-C reduce la activación de VEGFR2 inducida por VEGF-C *in vitro*. La activación del receptor se ensaya mediante la producción de pVEGFR2 en respuesta a 10 minutos de estimulación de VEGF-A (20 ng/ml) o VEGF-C (200 ng/ml, R&D Systems) en presencia o en ausencia del anticuerpo anti-VEGF-C (10 µg/ml). Los valores se normalizaron a niveles totales de VEGFR2. pVEGFR2 y VEGFR2 total se detectaron usando kits de ELISA (R&D Systems).

Figura 12: Comparación de anticuerpos anti-VEGF-C de estructura murina y humana en un ensayo de proliferación. Las CEL proliferan en respuesta a 200 ng/ml de VEGF-C maduro (R&D Systems) en presencia o en ausencia de diferentes dosis de anticuerpos anti VEGF-C de estructura murina o humana (n= 6 para cada condición).

Figura 13: El anticuerpo anti-VEGF-C reduce la función inducida por VEGF-C *in vivo*. Imágenes representativas de córnea teñida con LYVE-1, indicando vasos linfáticos y sanguíneos que indican FITC-dextrano, que ilustran los efectos de la colocación intracórnea de sedimento de 150 ng de VEGF-C (círculo con unto) en la córnea normalmente avascular. La tinción puede cuantificarse como se muestra debajo de los paneles - las áreas a incluir como positivas en el análisis se han pseudocoloreado en los paneles inferiores.

Figura 14: El anticuerpo anti-VEGF-C reduce la función inducida por VEGF-C *in vivo*. La cuantificación de los recuentos de pixel evalúa la (A) angiogénesis y la (B) linfangiogénesis del tratamiento sistémico con anticuerpo anti-VEGF-C (10 mg/kg dos veces a la semana). \* $p < 0,05$ ; las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 15: El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una reducción de la angiogénesis tumoral en tumores 66c14 que se desarrollan ortotópicamente. A. Imágenes representativas de vasos teñidos con PECAM-1 en tumores 66c14 tratados con anticuerpo de control específico de isotipo (anti-ambrosía) (parte superior), o anticuerpo anti-VEGF-C (parte inferior). B. La cuantificación de la densidad de los vasos vasculares se determinó a partir de 6 imágenes representativas de cada uno de los 6 tumores por grupo, evaluado para el número de pixel medio por ImageJ. \* $p < 0,05$ ; las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 16: El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una reducción del crecimiento tumoral en tumores 66c14 como un solo agente o en combinación con anti-VEGF-A. A. Gráfico del volumen tumoral medio del estudio del modelo de tumor 66c14 analizado en la Figura 15. Dos veces por semana, por vía i. p., los animales recibieron dosis del anticuerpo anti-VEGF-C (10 mg/kg) una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 mm<sup>3</sup> y recibieron dosis durante todo el estudio. B. Gráfico del volumen tumoral medio de un estudio de modelo de tumor 66c14 independiente. Dos veces por semana, por vía i. p., los animales recibieron dosis del anticuerpo anti-VEGF-C (10 mg/kg), anticuerpo anti VEGF-C (5 mg/kg), o una combinación de ambos agentes, una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 mm<sup>3</sup> y recibieron dosis durante todo el estudio.

Figura 17: El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una supervivencia aumentada en tumores H460 como un solo agente o en combinación con el anticuerpo anti-VEGF-A. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para grupos de animales tratados dos veces a la semana i.p. con el anticuerpo anti-VEGF-C (10 mg/kg), anticuerpo anti-VEGF-A (5 mg/kg), o una combinación de ambos agentes, una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 mm<sup>3</sup>. Los tumores se dosificaron durante 5 semanas. Los animales se retiraron del estudio cuando el volumen tumoral alcanzó 1000 mm<sup>3</sup>.

Figura 18: El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una reducción de la angiogénesis tumoral en tumores H460 como un solo agente o en combinación con el anticuerpo anti VEGF-C. A. Imágenes representativas de vasos teñidos con MECA32 en tumores H460 tratados con anticuerpo de control (izquierda superior), anticuerpo anti-VEGF-A (derecha superior), anticuerpo anti-VEGF-C (izquierda inferior) o una combinación de anticuerpo anti-VEGF-A y el anticuerpo anti-VEGF-C (derecha inferior). B. La cuantificación de la densidad de los vasos vasculares se determinó a partir de 6 imágenes representativas de cada uno de los 6 tumores por grupo, evaluado para el

número de pixel medio por ImageJ. Los tumores se evaluaron al final del estudio. \* $p < 0,05$ ; las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 19: comparación de la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-VEGF-C de estructura murina y humana. Se desarrollaron estudios con el modelo de tumor 66c14 con cualquiera del anticuerpo anti-VEGF-C de estructura murina A o humana B. Se observan curvas de crecimiento tumoral similares en los diferentes estudios lo que sugiere actividad equivalente *in vivo*.

Figura 20: El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una reducción de la metástasis pulmonar en tumores 66c14. A. Imágenes representativas de pulmones de animales tratados con control (izquierda) y con el anticuerpo anti-VEGF-C (derecha). Los pulmones se inflaron antes de la fijación mediante perfusión ventricular cardiaca derecha. Los nódulos se resaltan en blanco para facilitar la visualización. B. Cuantificación por inspección visual del número de nódulos metastásicos por pulmón en animales tratados con el anticuerpo anti-VEGF-C y control.

Figura 21: A. El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una reducción de la metástasis pulmonar en tumores 66c14. Presentaciones tridimensionales de pulmones representativos escaneados con micro-CT que demuestran nódulos metastásicos (rojo) en animales tratados con el anticuerpo anti-VEGF-C y control. B. Tinción con H&E de un nódulo pulmonar (flecha) que demuestra células tumorales metastásicas. \* $p < 0,05$ ; las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 22: El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C produce una reducción de los vasos linfáticos tumorales. A. Imágenes representativas de vasos linfáticos teñidos con LYVE-1 en tumores 66c14 (fila superior) y C6 (fila inferior) tratados con anticuerpo de control (columna de la izquierda) o anticuerpo anti-VEGF-C (columna de la derecha). B. La cuantificación de la densidad de los vasos vasculares se determinó a partir de 6 imágenes representativas de cada uno de los 6 tumores por grupo, evaluado para el número de pixel medio por ImageJ. \* $p < 0,05$ ; las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 23: Las secuencias de aminoácidos L1, L2 y L3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC1, VC3 y VC4.

Figura 24: Las secuencias de aminoácidos H1, H2 y H3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC1, VC3 y VC4.

Figura 25: Las secuencias de aminoácidos L1, L2 y L3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC4, VC4.2, VC4.3, VC4.4 y VC4.5.

Figura 26: Las secuencias de aminoácidos H1, H2 y H3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC4, VC4.2, VC4.3, VC4.4 y VC4.5.

Figura 27: Las secuencias de aminoácidos L1, L2 y L3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC1, VC1.1, VC1.2, VC1.3, VC1.4, VC1.5, VC1.6, VC1.7, VC1.8, VC1.9, VC1.10, VC1.11 y VC1.12.

Figura 28: Las secuencias de aminoácidos H1, H2 y H3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC1, VC1.1, VC1.2, VC1.3, VC1.4, VC1.5, VC1.6, VC1.7, VC1.8, VC1.9, VC1.10, VC1.11 y VC1.12.

Figura 29: Las secuencias de aminoácidos L1, L2 y L3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC1.12, VC1.12.1, VC1.12.2, VC1.12.3, VC1.12.4, VC1.12.5, VC1.12.6, VC1.12.8, VC1.12.9 y VC1.12.10.

Figura 30: Las secuencias de aminoácidos H1, H2 y H3 para los anticuerpos anti-VEGF-C VC1.12, VC1.12.1, VC1.12.2, VC1.12.3, VC1.12.4, VC1.12.5, VC1.12.6, VC1.12.8, VC1.12.9 y VC1.12.10.

Figura 31: Tabla que resume los datos de afinidad de unión de los anticuerpos anti-VEGF-C VC1, VC3 y VC4.

Figura 32: El receptor bloquea las actividades de las IgG anti-VEGF-C VC1, VC3 y VC4. Las IgG anti-VEGF-C VC1, VC3 y VC4 bloquean la unión de VEGF-C humano marcado con biotina, con una placa recubierta con VEGFR3 de una manera dependiente de la dosis.

Figura 33: Tabla que resume los datos de  $CI_{50}$  de fagos de variantes de VC4 (VC4.2, VC4.3, VC4.4 y VC4.5) mejoradas por afinidad con el VEGF-C humano.

Figura 34: Tabla que resume la medición de la afinidad de unión cinética de la proteína Fab anticuerpo anti-VEGF-C VC4.5 y anticuerpo anti-VEGF-C VC4.5 IgG con VEGF-C humano (R&D systems) y VEGF-C humano C137S.

Figura 35: Tabla que resume los datos DE  $CI_{50}$  de fagos de variantes de VC1 (VC1.1, VC1.2, VC1.3, VC1.4, VC1.5, VC1.6, VC1.7, VC1.8, VC1.9, VC1.10, VC1.11 y VC1.12) mejoradas por afinidad con el VEGF-C humano.

Figura 36: Tabla que resume los datos  $CI_{50}$  de fagos de variantes de VC 1.12 (VC1.12.1, VC1.12.2, VC1.12.3, VC1.12.4, VC1.12.5, VC1.12.6, VC1.12.8, VC1.12.9 y VC1.12.10) mejoradas por afinidad con el VEGF-C humano C137S.

Figura 37: mapeo epitópico de anticuerpos anti-VEGF-C. VC4 tiene un epítipo diferente al de los anticuerpos de la serie VC3 y VC1.

Figura 38: Representa las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-VEGF-C VC1.12 y VC4.5.

Figura 39: Representa las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-VEGF-C VC1.12 y VC4.5.

Figura 40: Ensayo de proliferación celular – los anticuerpos anti-VEGF-C reducen la proliferación celular inducida por VEGF-C *in vitro*.

Figura 41: El anticuerpo anti-VEGF-C inhibe la fosforilación de VEGFR3 mediada por VEGF-C. El nivel de fosforilación de VEGFR3 se ensaya mediante el ensayo KIRA de VEGFR3. Durante 10 minutos se añadió VEGF-C (200 ng/ml) en presencia o en ausencia del anticuerpo anti-VEGF-C (10  $\mu$ g/ml) o de ECD VEGFR3 (10  $\mu$ g/ml) para evaluar la inducción de la fosforilación de VEGFR3 (n= 6 para cada condición). \* $p < 0,05$ ; Las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 42: El tratamiento con anticuerpo anti-VEGF-C reduce la permeabilidad vascular inducida por VEGF-C. Cuantificación de resultados del ensayo de permeabilidad vascular de piel de ratón. La cuantificación se determinó a partir del colorante azul de Evan extraído de muestras de piel en el ensayo de permeabilidad. Los animales se trataron con anticuerpo anti-VEGF-C (0,5 mg/ml) o con ECD VEGFR3 (1,0 mg/ml). Los valores mostrados son el promedio de 6 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; Las barras de error representan el error típico de la media.

Figura 43: La inhibición simultánea de VEGF-C y VEGF proporciona beneficio adicional a la estasia de crecimiento tumoral primario. A. Curva de crecimiento tumoral medio para A549 donde se alteró el orden de los tratamientos. Los tratamientos se administraron durante el tiempo indicado por las flechas a 5 mg/kg dos veces a la semana para el anticuerpo anti-VEGF y a 10 mg/kg dos veces a la semana para el anticuerpo anti-VEGF-C. B. Curva de crecimiento tumoral medio y curva de Kaplan Meier para el modelo de tumor H460 tratado con control, paclitaxel, anti-VEGF + paclitaxel o anti-VEGF + anti-VEGF-C + paclitaxel. Los tratamientos se administraron a 5 mg/kg dos veces a la semana para el anticuerpo anti-VEGF y a 10 mg/kg dos veces a la semana para el anticuerpo anti-VEGF-C durante 5 semanas cada uno y a 30 mg/kg cada dos días durante 10 días para paclitaxel.

Figura 44: Comparación de la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-VEGF-C de estructura de ratón usando el modelo tumoral 66c14.

Figura 45: Comparación de anticuerpos anti-VEGF-C en un ensayo de proliferación. La proliferación de CEL en respuesta a 200 ng/ml de VEGF-C maduro en presencia o en ausencia de diferentes dosis de anticuerpos anti-VEGF-C.

Figura 46: El tratamiento con Anti-VEGF-C produce una reducción del número de lesiones tumorales metastásicas en ratones.

#### Descripción detallada de la invención

La invención del presente documento proporciona anticuerpos aislados que se unen a VEGF-C, que son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de patologías asociadas con actividad de VEGF-C. También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como métodos de tratamiento. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar una afección patológica asociada con linfangiogénesis y angiogénesis.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-VEGF-C de la invención encuentran utilidad como reactivos para la detección y/o el aislamiento de VEGF-C, tal como la detección de VEGF-C en diversos tejidos y tipos de células.

La invención proporciona adicionalmente métodos para preparar anticuerpos anti-VEGF-C, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-VEGF-C.

#### Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento son generalmente bien entendidos y normalmente empleados, usando metodología convencional, por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); en la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley y Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cáncer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

#### Definiciones

Con la intención de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos que se usan en singular también incluirán el plural y viceversa.

En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido e incluye diversas estructuras de inmunoglobulina, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden

estar presentes en cantidades minoritarias. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a una sola diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su inmunogeneicidad *in vivo*, 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 típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos policlonal se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas ya que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y que no debe considerarse que se requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante diversas técnicas, entre las que se incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), los métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), las 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 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen todos los locus o genes, o partes de los mismos, 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 Immunol.* 7: 33 (1993); las patentes de Estados Unidos n.º. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Biotechnology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Bio-technol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo procede de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas procedentes de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable (HVR, *hypervariable region*), del receptor se reemplazan por los restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como de un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos FR (*framework regions*, regiones marco conservadas) 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 donador. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994); y las patentes de Estados Unidos n.º 6.982.321 y 7.087.409.

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 preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos son los métodos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a una exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han deshabilitado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.075.181 y 6.150.584 en relación con la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006) en relación con anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

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

Como se usa en el presente documento, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie, en el que uno o más de los restos de aminoácido del anticuerpo dependiente de especie se han modificado. Dichos mutantes tienen necesariamente una identidad o similitud de secuencia menor de 100 % con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de al menos 75 % con la secuencia de aminoácidos de cualquiera del dominio variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo dependiente de especie; en otra realización al menos un 80 %, en otra realización al menos un 85 %, en otra realización al menos un 90 %, e incluso en otra realización al menos un 95 %. En el presente documento, la identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, los mismos restos) o similares (es decir, restos de aminoácido del mismo grupo en función de las propiedades habituales de la cadena lateral, véase más adelante) a los restos de anticuerpos dependientes de especie, después de alinearse las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para obtener el porcentaje de identidad de secuencia máximo. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones del N-terminal, C-terminal, o internas, en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se considerará que afecta a la identidad o similitud de secuencia.

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 en la investigación, usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina, por ejemplo, mediante el método de Lowry y en algunas realizaciones, a más del 99 % en peso; (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de una secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso, por ejemplo, de un secuenciador de copa de giro, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, de manera habitual, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos naturales" normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestos de dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, en el que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente separados. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable ( $V_H$ ) seguido de diversos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo ( $V_L$ ) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se piensa que los restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse "VH." El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse "VL." Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

5 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren en gran parte en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida homogéneamente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) tanto  
10 en los dominios variables de cadena pesada como de cadena ligera. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR, *framework regions*). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forma bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lamina beta. Las HVR en cada cadena se sujetan muy próximas entre sí por las regiones  
15 FR y, con las HVR 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 anticuerpos.

20 Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a una de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes.

25 Dependiendo de las secuencias de aminoácido de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y algunas de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones  
30 tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general, por ejemplo, en Abbas *et al.* *Cellular and Mol. Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede formar parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con uno o más péptidos o proteínas distintos.

35 Las expresiones "anticuerpos de longitud completa" o "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se usan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define más adelante. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

40 Un "anticuerpos desnudo" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con una fracción citotóxica o radiomarcador.

45 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, comprendiendo preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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

55 El fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una realización, una especie Fv bicatenaria consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En una especie Fv monocatenaria (scFv, *single-chain Fv*), un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada pueden ligarse de forma covalente mediante un enlazador peptídico flexible de tal manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de en una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En su conjunto, las seis HVR confieren la especificidad de unión al antígeno con el anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de una Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que la de todo el sitio de unión.

65 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de

cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento Fab'-SH es la designación de Fab' en el que uno o más restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" (del inglés *single chain*, monocatenario) comprenden los dominios VH y VL de 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 con el antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), páginas 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a 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). Al usar un enlazador que sea demasiado corto como para permitir que se produzca el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); y en Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). En Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003) también se describen los triacuerpos y tetracuerpos.

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 cuya secuencia es hipervariable y/o que forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el dominio variable de cadena pesada (VH) (H1, H2, H3), y tres en el dominio variable de cadena ligera (VL) (L1, L2, L3). En los anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y en particular se piensa que H3 desempeña una función exclusiva al conferir una excelente especificidad a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson y Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural, que constan solo de una cadena pesada, son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

En el presente documento se incluyen y se usan diversas delineaciones de HVR. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *Complementarity Determining Regions*) de Kabat se basan en la variabilidad de la 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 los bucles estructurales (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Las HVR de los anticuerpos monoclonales (AbM) representan un acuerdo entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan en el programa informático de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas del complejo disponibles. A continuación se indican los restos de cada una de estas HVR.

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

Las HVR pueden comprender "HVR ampliadas" como se indica a continuación: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el dominio VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el dominio VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

Los restos de la "región marco conservada" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los de los restos de HVR como se define en el presente documento.

Las expresiones “numeración de restos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de la posición de aminoácido como en Kabat” y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, citados anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener pocos aminoácidos o aminoácidos adicionales, correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un solo inserto de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo determinado mediante alineamiento de las regiones de homología de la secuencia de anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración EU” o “índice EU” se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU indicado en Kabat *et al.*, citado anteriormente). El “índice EU como en Kabat” se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de IgG1 humano. A menos que se indique de otra manera en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio variable de los anticuerpos significan numeración de restos mediante sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique de otra manera en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio constante de los anticuerpos significan numeración de restos mediante el sistema de numeración EU (véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2008/0181888, Figuras para la numeración EU).

La expresión “anticuerpo multiespecífico” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ), en el que la unidad  $V_HV_L$  tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios  $V_L$  y  $V_H$  uniéndose cada unidad  $V_HV_L$  a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables sencillos uniéndose cada dominio variable sencillo a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos y triacuerpos y fragmentos de anticuerpo que se han ligado de manera covalente o no covalente. De acuerdo con una realización el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada epítipo con una afinidad de  $5 \mu\text{M}$  a  $0,001 \text{ pM}$ , de  $3 \mu\text{M}$  a  $0,001 \text{ pM}$ , de  $1 \mu\text{M}$  a  $0,001 \text{ pM}$ , de  $0,5 \mu\text{M}$  a  $0,001 \text{ pM}$ , o de  $0,1 \mu\text{M}$  a  $0,001 \text{ pM}$ .

“Especificidad poliepitópica” se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en el mismo antígeno o en antígenos diferentes. Por ejemplo, “biespecífico”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de unirse a dos epítopos diferentes. “Monoespecífico” se refiere a la capacidad de unirse solo a un epítipo.

La expresión “anticuerpos de dominios sencillo” (sdAbs, *single domain antibodies*) o “anticuerpos de dominio variable sencillo (SVD, *single variable domain*)” generalmente se refiere a anticuerpos en los que un dominio variable sencillo ( $V_H$  o  $V_L$ ) puede conferir unión antigénica. En otras palabras, el dominio variable sencillo no necesita interactuar con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Los ejemplos de anticuerpos de dominio sencillo incluyen los procedentes de camélidos (llamas y camellos) y de peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburón nodriza) y los procedentes de métodos recombinantes de anticuerpos de seres humanos y de ratón (Nature (1989) 341:544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30: 43-56; Trend Biochem Sci (2001) 26: 230-235; Trends Biotechnol (2003): 21: 484-490; documentos WO 2005/035572; WO 03/035694; Febs Lett (1994) 339: 285-290; documentos WO00/29004; WO 02/051870).

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995). De manera resumida, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ( $V_H\text{-}C_{H1}\text{-}V_H\text{-}C_{H1}$ ) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión antigénica. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las HVR del mismo que produce una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse utilizando determinados procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.* Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante la transposición de los dominios  $V_H$  y  $V_L$ . La mutagénesis al azar de restos de la HVR y/o de la región marco conservada se describe, por ejemplo, en Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154 (7): 3310-9 (1995); y en Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es un anticuerpo que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Determinados anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

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

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

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

- 20 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 natural 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 normalmente se define por el tramo desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo del mismo. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración 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 restos K447 no retirados y poblaciones de anticuerpos que tengan una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

- 30 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1q; CDC; unión al receptor de Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, del receptor de linfocitos B; BCR), 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 puede evaluarse usando diversos ensayos como se desvela, por ejemplo, en las definiciones del presente documento.

- 35 Una "región Fc de secuencia natural" 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 natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y no A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; una región Fc de IgG3 de secuencia natural; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como sus variantes de origen natural.

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

- 55 "Receptor de Fc " o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un RcR humano natural. En algunas realizaciones, un FcR 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 alternativas de corte y empalme de aquellos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM, *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) en su dominio citoplasmático. (Véase, por ejemplo, Dairon, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y en de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que vayan a identificarse en el futuro, se incluyen dentro del término "FcR" del presente documento.

- 65

La expresión "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., Immunol. Today 18 (12): 592-598 (1997); Ghetie *et al.*, Nature Biotechnology, 15 (7): 637-640 (1997); Hinton *et al.*, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216 (2004); y en el documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

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

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinadas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan una o más funciones ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) efectoras. Los ejemplos de leucocitos humanos que actúan como mediadores en la ADCC, incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural, por ejemplo, de sangre.

"La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos NK, neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruya la célula diana con citotoxinas. Las células primarias que actúan como mediadoras en la ADCC, los linfocitos KN, 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 de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337 o en la patente de Estados Unidos n.º 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen CMSP y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el que se desvela en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

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

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

Generalmente, "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otra manera, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción de 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno de una manera más rápida y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión, pudiendo usarse cualquiera de ellos para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y ejemplares para medir la afinidad de unión.

En una realización, la "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con la presente invención, se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA, *radiolabeled antigen binding assay*), realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab

por el antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen, *et al.*, J. Mol. Biol. 293: 865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, placas multipocillo MICROTITER<sup>®</sup> (Thermo Scientific) se revisten durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente a 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno-[<sup>125</sup>I] se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la valoración del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Después, el Fab de interés se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se llega al equilibrio. Después de esto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con TWEEN-20<sup>™</sup> al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20<sup>™</sup>; Packard), y en un contador gamma TOPCOUNT<sup>™</sup> (Packard) se realiza el recuento de las placas durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan una unión máxima menor que o igual a 20 % se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo con otra realización, la Kd o valor Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial con un BIACORE<sup>®</sup>-2000 o con un BIACORE<sup>®</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). De manera resumida, microplacas biodetectoras con dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (-0,2 µM) antes de LA inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie con factor 2 de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN-20<sup>™</sup> al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las constantes de velocidad de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir individualizado sencillo (programa informático BIACORE<sup>®</sup> Evaluation versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación (Kd) en equilibrio se calcula como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera  $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de desactivación de fluorescencia que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro dotado de flujo parado (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO<sup>™</sup> de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una constante de “velocidad de asociación” (*on-rate*) o “ $k_{on}$ ” de acuerdo con la presente invención también puede determinarse como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIACORE<sup>®</sup>-2000 o un BIACORE<sup>®</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las expresiones “sustancialmente similar” o “sustancialmente igual”, como se usan en el presente documento, indican un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de tal manera que un experto en la técnica pueda considerar que la diferencia entre los dos valores tenga poco o ningún significado biológico y/o estadístico dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor que aproximadamente 50 %, menor que aproximadamente 40 %, menor que aproximadamente 30 %, menor que aproximadamente 20 %, y/o menor que aproximadamente 10 %, en función del valor de referencia/comparador.

Las frases “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se usan en el presente documento, indican un grado de diferencia suficientemente alto entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de tal manera que un experto en la técnica pueda considerar que la diferencia entre los dos valores que tenga un significado estadístico dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor que aproximadamente 10 %, mayor que aproximadamente 20 %, mayor que aproximadamente 30 %, mayor que aproximadamente 40 % y/o mayor que aproximadamente 50 %, en función del valor de la molécula de referencia/comparadora.

Una “región marco conservada humana aceptora” para los fines del presente documento es una región marco conservada que comprende la secuencia de aminoácidos de una región marco conservada VL o VH procedente de una región marco conservada de inmunoglobulina humana o de una región marco conservada consenso humana. Una región marco conservada humana aceptora “procedente de” una región marco conservada de inmunoglobulina humana o de una región marco conservada consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas

realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes es de 10 o menor, de 9 o menor, de 8 o menor, de 7 o menor, de 6 o menor, de 5 o menor, de 4 o menor, de 3 o menor o de 2 o menor. Cuando los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes en un VH, preferentemente esos cambios se producen en solo tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácido en aquellas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, la región marco conservada humana aceptora VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región marco conservada de la inmunoglobulina humana VL o a la secuencia de la región marco conservada consenso humana.

Una “región marco conservada consenso humana” es una región marco conservada que representa los restos de aminoácidos que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias marco conservadas VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. En una realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, citado anteriormente.

Una “región marco conservada consenso de subgrupo III de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo III de la región variable de cadena pesada de Kabat *et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región marco conservada consenso del subgrupo III de VH comprende todas, o al menos una parte de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 63)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 64)-H2-RFTISADTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 65)-H3-WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 66). Véase la Figura 4.

Una “región marco conservada consenso de subgrupo I de VL” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo I kappa de la región variable de cadena ligera de Kabat *et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región marco conservada consenso del subgrupo I de VH comprende todas, o al menos una parte de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 67)-L1-WYQQKPKGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 68)-L2-GVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 69)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 70). Véase la Figura 5.

Como se usa en el presente documento, “conjunto de codones” se refiere a un conjunto de diferentes secuencias triplete de nucleótidos que se utilizan para codificar aminoácidos variantes deseados. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, incluyendo secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificarán el grupo de aminoácidos deseado. Una forma convencional para denominar los codones es la del código IUB, conocido en la técnica y que se describe en el presente documento. Un conjunto de codones típicamente se representa por tres letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similar. Por tanto, un “conjunto de codones no aleatorio”, como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de codones que codifica aminoácidos seleccionados que cumplen parcialmente, preferentemente por completo, los criterios para la selección de aminoácidos como se describe en el presente documento. La síntesis de oligonucleótidos con “degeneración” de nucleótidos seleccionados en determinadas posiciones es muy conocida en la técnica, por ejemplo, la estrategia TRIM (Knappik *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 296: 57-86); Garrard y Henner (1993) *Gene* 128: 103). Dichos conjuntos de oligonucleótidos, que tienen determinados conjuntos de codones, pueden sintetizarse utilizando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles, por ejemplo, en Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse en el comercio (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizado que tenga un conjunto de codones particular, típicamente incluirá una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia global. Los oligonucleótidos, como los que se usan de acuerdo con la presente invención, tienen secuencias que permiten efectuar la hibridación con un molde de ácido nucleico del dominio variable y también pueden, pero no necesariamente, incluir sitios de enzimas de restricción útiles, por ejemplo, con fines de clonación.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ( $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ ) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión antigénica. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

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

La “presentación de fagos” es una técnica mediante la cual se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión en al menos una parte de una proteína de recubrimiento en la superficie de las partículas del fago, por ejemplo, de un fago filamentoso. Una utilidad de la presentación de fagos consiste en que pueden clasificarse

bibliotecas grandes de variantes de proteínas aleatorizadas de manera rápida y eficaz por aquellas secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y de proteínas en fagos se ha utilizado para explorar millones de polipéptidos para determinar los que tienen propiedades de unión específicas. Se han utilizado métodos de presentación de fagos polivalente para presentar al azar péptidos pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones con el gen III o gen VIII de un fago filamentoso. Wells y Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 355-362, y referencias citadas en su interior. En una presentación de fagos monovalente, una biblioteca de proteínas o de péptidos se fusiona con un gen III, o con una parte del mismo, y se expresa a bajos niveles en presencia de la proteína del gen III de tipo silvestre de tal manera que las partículas del fago presenten una copia, o ninguna, de las proteínas de fusión. Los efectos de avidez se reducen con respecto al fago polivalente de tal manera que la clasificación es en función de la afinidad intrínseca por el ligando, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3: 205-0216.

Un "fagémido" es un vector plasmídico que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede usarse en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófagos filamentosos y bacteriófagos lambdoides. El plásmido también contendrá generalmente un marcador de selección para resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonado en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando se proporcionan células que alojan estos vectores con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a una replicación de círculo rodante para generar copias de una cadena del ADN plasmídico y empaquetar partículas de fago. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de recubrimiento de fago o un fragmento de la misma ligado a un gen de polipeptídico heterólogo como una fusión génica de tal manera que el polipéptido heterólogo se presenta sobre la superficie de la partícula de fago.

La expresión "vector de fago" significa una forma replicativa bicatenaria de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago lo que permite la replicación del fago y la formación de partículas de fago. El fago es, preferentemente, un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado de los mismos, o un fago lambda, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos.

Como se usa en el presente documento, una "posición accesible a un disolvente" se refiere a una posición de un resto de aminoácido en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo fuente o de un fragmento de unión a antígeno que se determina, basándose en la estructura, en el conjunto de estructuras y/o en la estructura modelada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como posiblemente disponible para el acceso al disolvente y/o para la puesta en contacto con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones se encuentran típicamente en las CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles a un disolvente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como se define en el presente documento, pueden determinarse utilizando cualquiera de los diversos algoritmos conocidos en la técnica. En una realización, las posiciones accesibles a un disolvente se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo, preferentemente usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). Las posiciones accesibles a un disolvente también pueden determinarse utilizando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379 and Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548). La determinación de posiciones accesibles a un disolvente puede realizarse usando un programa informático adecuado para el modelado de las proteínas y la información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El programa informático que puede utilizarse para esta finalidad incluye el programa informático SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Generalmente, cuando un algoritmo (programa) requiere que un usuario introduzca un parámetro de tamaño, el "tamaño" de una sonda que se usa en el cálculo se establece a aproximadamente 1,4 Angstrom o un radio más pequeño. Asimismo, la determinación de las regiones accesibles a un disolvente y los métodos de área usando programas informáticos para ordenadores personales se describe en Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18(4): 377-386.

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

Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de diversas líneas de células tumorales humanas en ratones desnudos (Kim *et al.*, *Nature* 362: 841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95: 1789-1797 (1995);

Borgström *et al.*, *Cancer Res.* 56: 4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56: 921-924 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos de retina isquémica. Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 114: 66-71 (1996). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción de VEGF son candidatos prometedores para el tratamiento de tumores y de diversos trastornos neovasculares intraoculares. Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento EP 817.648 publicado el 14 de enero de 1998; y en los documentos WO98/45331 y WO98/45332, ambos publicados el 15 de octubre de 1998. La FDA ha autorizado uno de los anticuerpos anti-VEGF, bevacizumab, para su uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar cáncer colorrectal (CRC) metastásico y cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC). Y bevacizumab se está investigando en muchos ensayos clínicos en curso para el tratamiento de diversos síntomas del cáncer.

También se conocen otros anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-Nrp1 y anticuerpos anti-Nrp2, y se describen, por ejemplo en Liang *et al.*, *J Mol Biol* 366, 815-829 (2007) y en Liang *et al.*, *J Biol Chem* 281, 951-961 (2006), en la publicación PCT número WO2007/056470 y en la Solicitud PCT n.º PCT/US2007/069179.

Un “factor o agente angiogénico” es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de los 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 (VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D), PlGF, familia de PDGF, familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ligando 4 similar a Delta (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos (aFGF y bFGF), folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de dispersión (SF), interleucina-8 (IL-8), leptina, midquina, neurofilinas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, factor  $\alpha$  de crecimiento transformante (TGF-alfa), factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), etc. También se incluirían factores que aceleran la cicatrización de heridas, tales como la hormona del crecimiento, factor I de crecimiento insulínico (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de esta familia, y TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53: 217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22: 3172-3179; Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 6549-6556 (por ejemplo, en la Tabla 1 se proporciona una lista de factores angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8: 200-206.

Un “agente antiangiogénesis” o un “inhibidor de la angiogénesis” se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, 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. Debe entenderse que el agente antiangiogénesis incluye aquellos agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista contra un agente angiogénico como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF-A o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, el receptor KDR o el receptor de Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec™ (Mesilato de Imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (sunitinib malato), AMG706, o los derivados, por ejemplo, de la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénesis también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53: 217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22: 3172-3179 (por ejemplo en la Tabla 3 se proporciona una lista de terapia antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 6549-6556 (por ejemplo, en la Tabla 2 se proporciona una lista de factores angiogénicos conocidos); y Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8: 200-206 (por ejemplo, en la Tabla 1 se proporciona una lista de agentes antiangiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

El término “VEGF” o “VEGF-A”, como se usa en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos y a factores de crecimiento celular endotelial vascular humano de 121, 189 y 206 aminoácidos relacionados, como se describe en Leung *et al.* (1989) *Science* 246: 1306 y en Houck *et al.* (1991) *Mol. Endocrin.* 5: 1806, junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de los mismos. El término “VEGF” también se refiere a los VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. Algunas veces, el VEGF de una especie específica se indica mediante términos tales como hVEGF por VEGF humano, mVEGF por VEGF murino y etc. El término “VEGF” también se usa para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 de los 165 aminoácidos del factor de crecimiento celular endotelial vascular humano. En la presente solicitud, pueden identificarse referencias a cualquiera de estas formas de VEGF, por ejemplo, mediante “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)” o “VEGF<sub>165</sub>”. Las posiciones de aminoácidos de un VEGF natural “truncado” se numeran como se indica en la secuencia de VEGF natural. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en el VEGF natural truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF natural. El VEGF natural truncado tiene una afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable a la del VEGF 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, pero sin limitación, su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF secuestrando de este modo su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF, tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas VEGFR. La expresión "antagonista de VEGF", como se usa en el presente documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen a VEGF y que son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF. Por tanto, la expresión "actividades de VEGF" incluye específicamente actividades biológicas de VEGF mediadas por VEGF.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF puede usarse como un agente terapéutico actuando sobre e interfiriendo con enfermedades o afecciones en las que interviene la actividad de VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF normalmente no se unirá con otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni con otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. En una realización, los anticuerpos anti-VEGF incluyen un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF, A4.6.1, producido por el hibridoma de la ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante (véase Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599), incluye, pero sin limitación, el anticuerpo conocido como "bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN<sup>®</sup>". AVASTIN<sup>®</sup> está actualmente disponible en el comercio. Bevacizumab comprende regiones marco conservadas de IgG<sub>1</sub> humana mutadas y regiones determinantes de la complementariedad de unión antigénica del anticuerpo murino A.4.6.1 que bloquea la unión del 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 IgG<sub>1</sub> humana, y aproximadamente el 7% de la secuencia procede de A4.6.1. Bevacizumab tiene un peso molecular de aproximadamente 149.000 dalton y está glucosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen adicionalmente en la Patente de Estados Unidos n.º 6.884.879, expedida el 26 de febrero del 2005. Otros anticuerpos anti-VEGF incluyen los anticuerpos de la serie G6 o B20 (por ejemplo G6-23, G6-31, B20-4.1), como se describe en la Publicación de la Solicitud PCT n.º WO2005/012359. Para anticuerpos adicionales, véanse, las Patentes de Estados Unidos n.º 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; Publicación de la Solicitud de la Patente de Estados Unidos n.º 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; y Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288: 149-164 (2004).

La expresión "polipéptido de la serie B20" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido, incluyendo un anticuerpo que se une a VEGF. Los polipéptidos de la serie B20 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos procedentes de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo procedente de B20 descrito en la Publicación US n.º 20060280747, Publicación US n.º 20070141065 y/o Publicación US n.º 20070020267. En una realización, el polipéptido de la serie B20 es B20-4.1 como se describe en la Publicación de Estados Unidos n.º 20060280747, Publicación de Estados Unidos n.º 20070141065 y/o Publicación de Estados Unidos n.º 20070020267. En otra realización, el polipéptido de la serie B20 es B20-4.1.1 descrito en la Publicación PCT n.º WO 2009/073160.

La expresión "polipéptido de la serie G6" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido, incluyendo un anticuerpo que se une a VEGF. Los polipéptidos de la serie G6 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos procedentes de una secuencia del anticuerpo G6 o un anticuerpo procedente de G6 descrito en la Publicación de Estados Unidos n.º 20060280747, Publicación de Estados Unidos n.º 20070141065 y/o Publicación de Estados Unidos n.º 20070020267. Los polipéptidos de la serie G6, como se describe en la Publicación de Estados Unidos n.º 20060280747, Publicación de Estados Unidos n.º 20070141065 y/o Publicación de Estados Unidos n.º 20070020267 incluyen, pero sin limitación, G6-8, G6-23 y G6-31.

Se sabe que VEGF-C, un miembro de la familia de VEGF, se une a al menos dos familias de receptores de la superficie celular, los receptores de tirosina quinasa VEGF y los receptores de neurofilina (Nrp). De los tres receptores de VEGF, VEGF-C puede unirse a VEGFR2 (receptor KDR) y a VEGFR3 (receptor Flt-4) lo que conduce a la dimerización del receptor (Shinkai *et al.*, *J Biol Chem* 273, 31283-31288 (1998)), activación y autofosforilación de quinasa (Heldin, *Cell* 80, 213-223 (1995); Waltenberger *et al.*, *J. Biol Chem* 269, 26988-26995 (1994)). El receptor fosforilado induce la activación de múltiples sustratos lo que conduce a angiogénesis y linfangiogénesis (Ferrara *et al.*, *Nat Med* 9, 669-676 (2003)).

VEGF-C es uno de los mediadores mejor estudiados del desarrollo linfático. Se ha mostrado que la sobreexpresión de VEGF-C en las células tumorales promueve la linfangiogénesis asociada a tumores, dando como resultado una metástasis potenciada en los nódulos linfáticos regionales (Karpanen *et al.*, *Faseb J* 20, 1462-1472 (2001); Mandriota *et al.*, *EMBO J* 20, 672-682 (2001); Skobe *et al.*, *Nat Med* 7, 192-198 (2001); Stacker *et al.*, *Nat Rev Cancer* 2, 573-583 (2002); Stacker *et al.*, *Faseb J* 16, 922-934 (2002)). La expresión de VEGF-C también se ha correlacionado con linfangiogénesis asociada a tumores y metástasis de ganglios linfáticos para diversos cánceres humanos (revisado en Achen *et al.*, 2006, citado anteriormente. Además, el bloqueo de la señalización mediada por VEGF-C se ha observado que suprime la linfangiogénesis tumoral y la metástasis de ganglios linfáticos en ratones

(Chen *et al.*, Cancer Res 65, 9004-9011 (2005); He *et al.*, J. Natl Cancer Inst 94, 8190825 (2002); Krishnan *et al.*, Cancer Res 63, 713-722 (2003); Lin *et al.*, Cancer Res 65, 6901-6909 (2005)).

5 Las expresiones “factor C de crecimiento endotelial vascular”, “VEGF-C”, “VEGFC”, “proteína relacionada con VEGF”, “VRP”, “VEGF2” y “VEGF-2” se usan indistintamente, y se refieren al polipéptido de longitud completa y/o a los fragmentos activos del polipéptido de longitud completa. En una realización, los fragmentos activos incluyen cualquier parte de la secuencia de aminoácidos de longitud completa que tiene menos de los 419 aminoácidos completos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 87. Dichos fragmentos activos contienen actividad biológica de VEGF-C e incluyen, pero sin limitación, VEGF-C maduro. En 10 una realización, el polipéptido VEGF-C de longitud completa se procesa proteolíticamente para producir una forma madura del polipéptido VEGF-C, también denominado VEGF-C maduro. Dicho procesamiento incluye la escisión de un péptido señal y la escisión de un péptido amino terminal (correspondiente a aproximadamente 1-102 aminoácidos de SEQ ID NO: 87) y la escisión de un péptido carboxilo terminal (correspondiente a aproximadamente 228-419 aminoácidos de SEQ ID NO: 87) para producir una forma madura completamente procesada (véase la Figura 6). 15 Pruebas experimentales demuestran que el VEGF-C de longitud completa, formas parcialmente procesadas de VEGF-C y formas maduras completamente procesadas de VEGF-C pueden unirse a VEGFR3 (receptor Flt-4). Si embargo, la alta afinidad de unión a VEGFR2 se produce únicamente con las formas maduras completamente procesadas de VEGF-C.

20 El término “VEGF-C” también se refiere a VEGF-C de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. Algunas veces, el VEGF-C de una especie específica se indica con términos tales como hVEGF-C para VEGF-C humano, mVEGF-C para VEGF-C murino y etc.

25 Las expresiones “C137S”, “VEGF-C C137S”, “factor C de crecimiento endotelial vascular C137S”, “VEGFC C137S” y “hVEGF-C C137S” se usan indistintamente, y se refiere al polipéptido de longitud completa y a los fragmentos del polipéptido de longitud completa en el que el resto de cisteína en la posición del resto de aminoácido 137 se ha reemplazado por un resto de serina como se muestra en la SEQ ID NO: 88.

30 La expresión “antagonista de VEGF-C” se usa en el presente documento para referirse a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF-C. En determinadas realizaciones, antagonista de VEGF se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con la capacidad de VEGF-C para modular la angiogénesis, la migración, proliferación de células endoteliales (CE) linfáticas o la linfangiogénesis en adultos, especialmente linfangiogénesis tumoral y metástasis tumoral. Los antagonistas de VEGF-C incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-VEGF-C y fragmentos de unión a 35 antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF-C secuestrando de este modo su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti receptor de VEGF-C y antagonistas del receptor de VEGF-C tal como inhibidores de molécula pequeña de VEGFR2 y VEGFR3. La expresión “antagonista de VEGF”, como se usa en el presente documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas que se unen a VEGF-C y 40 que pueden neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF-C. Por tanto, la expresión “actividades de VEGF-C” incluye específicamente actividades biológicas de VEGF-C mediadas por VEGF-C (como se ha definido antes en el presente documento).

45 La expresión “anticuerpo anti-VEGF-C” o “un anticuerpo que se une a VEGF-C” se refiere a un anticuerpo que puede unirse a VEGF-C con suficiente afinidad de tal manera que el anticuerpo es útil como un agente terapéutico y/o de diagnóstico en el direccionamiento de VEGF-C. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-VEGF-C con una proteína no VEGF-C no relacionada, es menor que aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo con VEGF-C, medido, por ejemplo mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a VEGF-C tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ , o  $\leq 0,1 \text{ nM}$ . En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-C se une a un epítipo de VEGF-C que está 50 conservado entre el VEGF-C de diferentes especies.

La expresión “actividad biológica” y “biológicamente activo” con respecto a un polipéptido VEGF-C se refiere a propiedades físicas/químicas y funciones biológicas asociadas con VEGF-C de longitud completa y/o maduro. En algunas realizaciones, “actividad biológica” de VEGF-C significa que tiene la capacidad de unirse a, y estimular la fosforilación, del receptor Flt-4 (VEGFR3). Generalmente, VEGF-C se unirá al dominio extracelular del receptor Flt-4 y por lo tanto activará o inhibirá su dominio tirosina quinasa intracelular. Por consiguiente, la unión de VEGF-C con el receptor puede dar como resultado la potenciación o inhibición de la proliferación y/o diferenciación y/o activación de células que tienen el receptor Flt-4 para el VEGF-C *in vitro* o *in vivo*. La unión de VEGF-C con el receptor Flt-4 60 puede determinarse usando técnicas convencionales, incluyendo métodos competitivos de unión, tales como RIA, ELISA y otros ensayos competitivos de unión. Los complejos ligando/receptor pueden identificarse usando dichos métodos de separación, tales como filtración, centrifugación, citometría de flujo (véase, por ejemplo Lyman *et al.*, Cell, 75: 1157-1167 [1993]; Urdal *et al.*, J. Biol. Chem., 263: 2870-2877 [1988]; y Gearing *et al.*, EMBO J., 8: 3667-3676 [1989]), y similares. Los resultados de los estudios de unión pueden analizarse utilizando cualquier representación gráfica convencional de los datos de unión, tales como análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci., 51: 660-672 [1949]; Goodwin *et al.*, Cell, 73: 447-456 [1993]), y similares. Dato que el VEGF-C induce la 65

fosforilación del receptor Flt-4, también pueden usarse ensayos de fosforilación de tirosina convencionales como una indicación de la formación de un complejo receptor Flt-4/VEGF-C. En otra realización, “actividad biológica” de VEGF-C significa que tiene la capacidad de unirse al receptor KDR (VEGFR2). permeabilidad vascular, así como la migración y proliferación de células endoteliales. En determinadas realizaciones, la unión de VEGF-C con el receptor KDR puede dar como resultado la potenciación o inhibición de la permeabilidad vascular, así como la migración y/o proliferación y/o diferenciación y/o activación de células endoteliales que tienen el receptor KDR para el VEGF-C *in vivo* o *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (y variaciones tales como “tratar” o “tratando”) se refieren a intervención clínica en un intento de alterar el transcurso natural del individuo o de la célula que se esté tratando, y puede realizarse bien por profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseados del tratamiento incluyen prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para reducir la progresión de una enfermedad o trastorno.

Administración “crónica” se refiere a la administración de uno o más agentes en un modo continuo a diferencia de en un modo intensivo, 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, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

Un “trastorno” es cualquier afección que se benefice del tratamiento. Por ejemplo, los mamíferos que padecen, o que necesitan profilaxis contra una angiogénesis anómala (angiogénesis excesiva, inapropiada o no controlada) o permeabilidad vascular. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas(as) e intensos(as), que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Como ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento se incluyen tumores benignos y malignos; neoplasias no leucémicas y linfoides; y, en particular metástasis (cáncer) tumoral.

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 celular neoplásico, ya sea maligno o benigno y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso” y las expresiones “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor”, a los que se hace referencia en el presente documento, no son mutuamente exclusivos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer estromal gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cancer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin (LNH) de grado bajo/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH con enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPP), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meig, cáncer de cerebro así como de cabeza y cuello y metástasis asociadas. En determinadas realizaciones, los cánceres que se prestan a tratamiento con los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer pulmonar no microcítico, glioblastoma, linfoma no Hodgkin (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoideo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pulmonar microcítico, glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC) y carcinoma hepatocelular. Incluso, en algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pulmonar no microcítico, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de ovario, glioblastoma y carcinoma de mama, incluyendo formas metastásicas de estos cánceres.

Por “metástasis” se refiere a la propagación del cáncer desde su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerosas pueden separarse de un tumor primario, introducirse en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través de la corriente sanguínea y crecer en un foco distante (metastatizar) en tejidos normales en cualquier parte del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, contingente en las células tumorales que se separan del tumor primario, desplazándose a través de la corriente sanguínea o sistema linfático, y deteniéndose en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un aporte sanguíneo y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal. En determinadas realizaciones, la expresión tumor metastático se refiere a un tumor que puede metastatizar, pero que aún no ha metastatizado en tejidos u órganos en cualquier parte del cuerpo. En determinadas realizaciones, la expresión tumor metastático se refiere a un tumor que ha metastatizado en tejidos u órganos en cualquier parte del cuerpo.

Las expresiones “órgano metastático” o “tejido metastático” se usan en el sentido más amplio y se refieren a un órgano o a un tejido en el que se han propagado las células cancerosas de un tumor primario, o las células cancerosas de otra parte del cuerpo. Los ejemplos de órganos y tejidos metastáticos incluyen, pero sin limitación pulmón, hígado, cerebro, ovario, hueso o médula ósea.

El “órgano premetastático” o “tejido premetastático”, de la manera en la que estas expresiones se usan en el presente documento, se refieren a un órgano o a un tejido en el que no se ha detectado ninguna célula cancerosa de un tumor primario o de cualquier otra parte del cuerpo. En determinadas realizaciones, el órgano o tejido premetastático, de la manera en la que estas expresiones se usan en el presente documento, se refiere a un órgano o a un tejido que está en la fase anterior de que se produzca la propagación de las células cancerosas de un tumor primario o de cualquier otra parte del cuerpo, a este órgano o tejido. Los ejemplos de órganos o tejidos premetastáticos incluyen, pero sin limitación, pulmón, hígado, cerebro, ovario, hueso y médula ósea.

Por “tumor primario” o “cáncer primario” se entiende el cáncer original y no una lesión metastática localizada en otro tejido, órgano o lugar en el cuerpo de un individuo.

“Recurrencia del cáncer” en el presente documento se refiere a un retorno del cáncer después del tratamiento, e incluye retorno del cáncer en el órgano primario, así como recurrencia distante, en la que el cáncer retorna fuera del órgano primario.

Por “carga tumoral” se entiende el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor, o la cantidad de cáncer en el cuerpo. La carga tumoral también recibe el nombre de volumen tumoral.

Por “número de tumores” se entiende la cantidad de tumores.

“Refractario” se refiere a la resistencia o incapacidad de respuesta de una enfermedad o afección al tratamiento (por ejemplo, el número de células plasmáticas neoplásicas aumenta incluso aunque se de el tratamiento). En determinadas realizaciones, el término “refractario” se refiere a una resistencia o a una incapacidad de respuesta a cualquier tratamiento previo, incluyendo, pero sin limitación, tratamientos con un antagonista de VEGF, con agentes antiangiogénicos y con quimioterapia. En determinadas realizaciones, el término “refractario” se refiere a una incapacidad de respuesta inherente de una enfermedad o afección a cualquier tratamiento previo que comprende un tratamiento con un antagonista de VEGF, con agentes antiangiogénicos y/o con quimioterapia. En determinadas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

“Recaída” se refiere a la regresión de la dolencia del paciente de nuevo a su patología anterior, especialmente el retorno de los síntomas después de una recuperación aparente o recuperación parcial. En determinadas realizaciones, el estado de recaída se refiere al proceso de retornar a, o al retorno de, la dolencia antes del tratamiento previo, incluyendo, pero sin limitación, tratamiento con un antagonista de VEGF, con agentes antiangiogénicos y/o con quimioterapia. En determinadas realizaciones, el estado de recaída se refiere al proceso de retornar a, o al retorno de, la dolencia después de una respuesta inicial fuerte a una terapia contra el cáncer, que comprende tratamiento con un antagonista de VEGF, con agentes antiangiogénicos y/o con quimioterapia. En determinadas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF.

Las expresiones “terapia contra el cáncer” o “terapia del cáncer” se refieren a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), un inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo GLEEVEC<sup>®</sup> (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), Erbitux<sup>®</sup> (cetuximab, Imclone), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-β, BlyS, APRIL, BCMA o uno o más receptores de VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. En la invención también se incluyen combinaciones de los mismos.

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

El término “muestra” o la expresión “muestra biológica”, como se usan en el presente documento, se refieren a una composición que se obtiene o procede de un sujeto de interés, que contiene una entidad celular y/o molecular distinta que se caracteriza y/o identifica, por ejemplo, en función de características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. En determinadas realizaciones, la definición incluye muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico y muestras tisulares tales como un espécimen de biopsia o cultivos tisulares o células procedentes de los mismos. La fuente de la muestra tisular puede ser tejido sólido como de una muestra de un órgano o tejido reciente, congelada y/o conservada o de una biopsia o aspirado; los constituyentes sanguíneos o cualquier constituyente sanguíneo; fluidos corporales; y células en cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto o plasma.

En otra realización, la definición incluye muestras biológicas que se han manipulado de cualquier manera después de su obtención, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento con determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o que se han embebido en una matriz semisólida o sólida para realizar secciones. En determinadas realizaciones, una “sección” de una muestra tisular significa una sola parte o trozo de una muestra tisular, por ejemplo, un corte fino en rodajas de tejido o células de una muestra tisular.

Las muestras incluyen, pero sin limitación, líneas celulares o células primarias o cultivadas, sobrenadantes celulares, lisados celulares, plaquetas, suero, plasma, líquido vítreo, líquido linfático, líquido sinovial, líquido folicular, líquido seminal, líquido amniótico, leche, sangre entera, orina, líquido cerebroespinal, saliva, esputo, lágrimas, sudor, mucosidad, lisados tumorales y medio de cultivo tisular, así como extractos tisulares, tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral y extractos celulares.

En una realización, la muestra es una muestra clínica. En otra realización, la muestra se usa en un ensayo de diagnóstico. En determinadas realizaciones, la muestra se obtiene de un órgano o tejido premetastásico. En determinadas realizaciones, la muestra se obtiene de un tumor primario o metastásico. La biopsia tisular a menudo se usa para obtener un trozo representativo de tejido tumoral. Como alternativa, las células tumorales pueden obtenerse indirectamente en forma de tejidos o fluidos que se sabe o se piensa que contienen las células tumorales de interés. Por ejemplo, las muestras de lesiones de cáncer pulmonar pueden obtenerse por resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, lavados bronquiales o de esputo, líquido pleural o sangre.

En determinadas realizaciones, una muestra se obtiene de un sujeto o paciente antes del tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-C. En determinadas realizaciones, una muestra se obtiene de un sujeto o paciente después del tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-C. En determinadas realizaciones, una muestra se obtiene de un sujeto o pacientes antes de la terapia con un antagonista de VEGF. En determinadas realizaciones una muestra se obtiene de un sujeto o paciente antes de la terapia con un anticuerpo anti-VEGF. En determinadas realizaciones, una muestra se obtiene antes de que un cáncer haya metastatizado. En determinadas realizaciones, una muestra se obtiene después de que el cáncer haya metastatizado.

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 de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y peso del individuo y de la capacidad de la sustancia/molécula para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz incluye una cantidad en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos sobrepasan cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que en los sujetos se usa una dosis profiláctica antes de la enfermedad, o en una fase temprana de la misma, la cantidad profilácticamente eficaz sería menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término “eficacia” se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc para producir un efecto deseado. En determinadas realizaciones, eficacia se refiere al efecto máximo observado de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc a niveles de saturación. En determinadas realizaciones, eficacia se refiere a la CE<sub>50</sub> de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc. En determinadas realizaciones, eficacia se refiere a la fuerza de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc. En determinadas realizaciones, la eficacia se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc para producir efectos beneficiosos durante el transcurso o duración de una enfermedad, incluyendo beneficio clínico, como se define en el presente documento.

El término concentración eficaz media “CE<sub>50</sub>” se refiere a la concentración de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc que induce una respuesta media entre el valor inicial y el máximo. En determinadas realizaciones, la CE<sub>50</sub> representa la concentración de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de fusión a Fc en la que se observa el 50 % de su efecto máximo. En determinadas realizaciones, la CE<sub>50</sub> representa la concentración en plasma o suero necesaria para obtener un 50 % del efecto máximo *in vivo*.

La eficacia en el tratamiento del cáncer puede demostrarse detectando la capacidad de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada, o una composición de la invención, para inhibir o reducir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas o para mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados con cáncer. El tratamiento se considera terapéutico si hay, por ejemplo, una reducción en el crecimiento o metástasis de las células cancerosas, una mejora de uno o más síntomas asociados con cáncer, o una disminución en la mortalidad y/o morbilidad después de la administración de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada, o una composición de la invención. Los anticuerpos, proteínas de fusión o composiciones de la invención pueden ensayarse con respecto a su capacidad para reducir la formación de tumores en ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse también, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP, *time to disease progression*), tasas de respuesta (RR, *response rates*), duración de la respuesta, y/o la calidad de vida.

El beneficio clínico puede medirse evaluando diversos criterios de valoración, por ejemplo, inhibición, hasta cierto grado, de la progresión de la enfermedad, incluyendo la ralentización y detención completa; reducción en el número de episodios y/o síntomas de la enfermedad, reducción del tamaño de la lesión; inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de las células enfermas en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la propagación de la enfermedad; disminución de la respuesta autoinmunitaria, que puede producir, aunque no tiene por qué, la regresión o ablación de la lesión de la enfermedad; alivio, hasta cierto grado, de uno o más síntomas asociados con el trastorno, aumento de la duración de la presentación sin enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, supervivencia sin progresión; supervivencia total aumentada; mayor tasa de respuesta; y/o mortalidad disminuida en un momento determinado después del tratamiento.

Por “terapia de mantenimiento” se entiende un régimen terapéutico que se da para reducir la probabilidad de recurrencia o progresión de la enfermedad. La terapia de mantenimiento puede proporcionarse durante cualquier duración de tiempo, incluyendo periodos de tiempo prolongados hasta durante toda la vida del sujeto. La terapia de mantenimiento puede proporcionarse después de terapia inicial o junto con terapias iniciales o adicionales. Las dosificaciones usadas para la terapia de mantenimiento pueden variar y pueden incluir dosificaciones disminuidas en comparación con dosificaciones usadas para otros tipos de terapia.

“Terapia adyuvante” en el presente documento se refiere a terapia recibida después de cirugía, en la que no pueden detectarse signos de enfermedad residual, para reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad. El objetivo de la terapia adyuvante es prevenir la recurrencia del cáncer y por lo tanto reducir la probabilidad de muerte relacionada con cáncer.

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

Los términos “simultáneamente” o “concurrentemente” se usan en el presente documento para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se solapa en el tiempo. Por consiguiente, la administración concurrente incluye un régimen de dosificación en el que la administración de uno o más agentes continúa después de interrumpir la administración de uno o más agentes distintos.

La expresión “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del principio activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se le administre la formulación. Dichas formulaciones han de ser estériles.

Una formulación “estéril” es aséptica o carece de cualquier microorganismo vivo y sus esporas.

Los “transportadores”, de la manera en la que se usan en el presente documento, incluyen transportadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o para el mamífero que se está exponiendo a los mismos, a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el transportador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tampón. Los ejemplos de transportadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo 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, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA, alcoholes de

azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o un tensioactivo que es útil para suministrar un fármaco (tal como un polipéptido de VEGF-C o anticuerpo con este) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen normalmente en una formación bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

La expresión "composición antineoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente contra el cáncer". Los ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anticancerosos) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), un inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo erlotinib (Tarceva™), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo Gleevec™ (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de las siguientes dianas: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-β, BlyS, APRIL, BCMA o uno o más receptores de VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. También se incluyen en la invención combinaciones de los mismos.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radiactivos de Lu) agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina etopósido) doxorubicina, mefalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos desvelados a continuación. A continuación se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa destrucción de las células tumorales.

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

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamina; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamina, trietilenetiofosforamina y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipódido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamina, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos de enediina (por ejemplo, caliceamicina, especialmente caliceamicina gamma11 y caliceamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina cromoproteínas relacionadas), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de clorhidrato de doxorubicina (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; pemetrexed (ALIMTA®); gemcitabina (GEMZAR®); anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una eptilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamina; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina;

bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfosfamina; demecolcina; diacicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; ionidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, O);  
 5 razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietil- amina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®);  
 10 dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas modificada con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinóico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamina, doxorubicina, vincristina, y prednisona, y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y que a menudo están en forma de tratamiento corporal sistémico o completo. Estos pueden ser las propias hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4- hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores negativos de receptores de estrógeno (ERD); agentes que actúan suprimiendo o inhabilitando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), tales como, acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regulan la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestatina, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®), y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zolenódrico/ zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tal 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 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); inhibidores de COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) bencenesulfonamida); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Cuando en el presente documento se usa un "agente inhibidor del crecimiento", se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa VEGF-C o células que actúan sobre VEGF-C) *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que impide o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. En otra realización, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar que no sea la fase S), tales como agentes que inducen la detención de la fase G1 y de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen la fase G1 también se extienden en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazona, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son agentes anticancerosos ambos procedentes del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhona-Poulenc Rorer), procedente del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Miers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan 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, el crecimiento celular anómalo o incontrolable, la metástasis, la interferencia con el funcionamiento normal de las células adyacentes, la liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anómalos, la supresión o el agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, 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 que puede activarse o transformarse enzimáticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, páginas. 375-382, 615th Meeting Belfast y Stella *et al.* (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), páginas. 247-267, Humana Press. 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 con D aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden transformarse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma farmacológica para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

En el presente documento una "molécula pequeña" se define por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

"Purificado(a)" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos un 95 % en peso, o al menos un 90 % en peso de la muestra en la que está contenida.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que está habitualmente asociada, por ejemplo, en su entorno natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye adicionalmente una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de la de su localización cromosómica natural.

El término "vector", de la manera en la que se usa en el presente documento, pretende referirse a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el cual se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que se han ligado segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma de virus. Determinados vectores son capaces de efectuar replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados factores pueden dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" o simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante, están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más habitualmente usada.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por la ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, la modificación en la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una o más modificaciones realizadas después de la síntesis, tal como una conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protecciones", sustituciones de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), las que contienen fracciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquilantes, tales como con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de uno o más polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilos habitualmente presentes en los azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse con grupos protectores o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o con fracciones de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También pueden derivatizarse otros hidroxilos en grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares

carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos tal como aribinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, pseudoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, sin limitación, realizaciones en las que el fosfato está reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO, o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido conteniendo opcionalmente un enlace éter (-O-) arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido deben ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que generalmente, aunque no necesariamente, tienen una longitud menor de aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La anterior descripción de polinucleótidos es igualmente y por completo aplicable a los oligonucleótidos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para obtener el porcentaje de identidad de secuencia máximo y sin considerar ninguna de las sustituciones conservativas como parte de la entidad de secuencia. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos el alineamiento puede realizarse de diversas maneras que están dentro de la habilidad de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles para el público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNAS- TAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para el alineamiento de secuencias, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para obtener el alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias a comparar. Sin embargo, para los fines del presente documento, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 lo autorizó Genentech, Inc., y el código de origen se ha archivado con documentación de usuario en el U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado con el número de registro Copyright U.S. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede compilarse desde el código de origen. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que para establecer comparaciones de secuencias de aminoácidos, se emplea ALIGN-2, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada con respecto a, o frente a, una secuencia de aminoácidos B determinada (que como alternativa puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o que comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, o frente a, una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de restos de aminoácido puntuados como equivalentes idénticos mediante el programa de alineamiento de secuencias ALIGN- 2 en ese alineamiento del programa de A y B, y en el que Y es el número total de restos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. a menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

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

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN de una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de manera que se facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no

tienen que ser contiguos. La unión se realiza por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula primaria en cuestión y los cultivos procedentes de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que es posible que toda la descendencia no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la explorada en la célula originalmente transformada. Cuando se deseen distintas designaciones, esto estará claro en el contexto.

"Recurrencia de cáncer" se refiere en el presente documento a un retorno de cáncer después del tratamiento. En una realización, la recurrencia de cáncer incluye el retorno de cáncer en la mama, así como recurrencia distante, donde el cáncer retorna fuera de la mama.

#### *Composiciones de la invención*

Un acontecimiento clave en el proceso multietapa de la metástasis implica la salida de una célula tumoral lejos de la masa tumoral primaria. Para los tumores sólidos, el sistema linfático a menudo proporciona una vía para las células salientes. Se sabe que VEGF-C es un modulador clave de la angiogénesis, linfangiogénesis y metástasis en muchos modelos tumorales y la inhibición del eje VEGF-C se considera como una estrategia prometedora para inhibir el desarrollo de la metástasis.

Los estudios subyacentes de la presente invención, que se presentan más adelante en los ejemplos, confirman una importante función de VEGF-C en la angiogénesis, linfangiogénesis tumoral y metástasis. Además, los datos expuestos en los ejemplos demuestran la presencia de vasos linfáticos funcionales dentro de los tumores y muestran que el tratamiento con anti-VEGF-C produce una reducción de estos vasos linfáticos funcionales. Véanse también las Figuras 7-9, 12-14 y 22.

La invención incluye realizaciones de polinucleótidos y anticuerpos aislados. En una realización, se purifica un anticuerpo anti-VEGF-C.

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

En una realización, los anticuerpos anti-VEGF-C de la invención son monoclonales. En otra realización más, los anticuerpos anti- VEGF-C son policlonales. También se incluyen dentro del ámbito de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos anti- VEGF-C proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse por técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para el diagnóstico y los propósitos expuestos a continuación. En una realización, un anticuerpo anti- VEGF-C es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden presentarse en menores cantidades. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales ejemplares procedentes de una fagoteca y se describen en el Ejemplo 1. Estos anticuerpos incluyen, pero sin limitación VC1, VC1.1, VC1.2, VC1.3, VC1.4, VC1.5, VC1.6, VC1.7, VC1.8, VC1.9, VC1.10, VC1.11, VC1.12, VC1.12.1, VC1.12.2, VC1.12.3, VC1.12.4, VC1.12.5, VC1.12.6, VC1.12.8, VC1.12.9, VC1.12.10, VC3, VC4, VC4.2, VC4.3, VC4.4, VC4.5. Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de VC1, VC1.1, VC1.2, VC1.3, VC1.4, VC1.5, VC1.6, VC1.7, VC1.8, VC1.9, VC1.10, VC1.11, VC1.12, VC1.12.1, VC1.12.2, VC1.12.3, VC1.12.4, VC1.12.5, VC1.12.6, VC1.12.8, VC1.12.9, VC1.12.10, VC3, VC4, VC4.2, VC4.3, VC4.4, VC4.5 se muestran en la Figura 1 a-f. Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti- VEGF-C también se muestran en las Figuras 23-30 y 38-39.

Las secuencias de HVR-H3 de los anticuerpos VC1, VC1.1, VC1.2, VC1.3, VC1.4, VC1.5, VC1.6, VC1.7, VC1.8, VC1.9, VC1.10, VC1.11, VC1.12, VC1.12.1, VC1.12.2, VC1.12.3, VC1.12.4, VC1.12.5, VC1.12.6, VC1.12.8, VC1.12.9, VC1.12.10 no tienen restos de aminoácido en las posiciones 100a, 100b, 100c, 100d y 100e. La

secuencia de HVR-H3 del anticuerpo VC3 no tiene resto de aminoácido en la posición 100d. Véanse también las Figuras 24, 28 y 30.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales que se unen a VEGF-C o un fragmento descrito en el presente documento, comprenden adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 297 en alanina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales que se unen a VEGF-C o un fragmento descrito en el presente documento comprenden adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 297 en alanina y en la posición 265 en alanina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C VC4.5 comprende la sustitución de aminoácido en la posición 297 con alanina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti- VEGF-C VC4.5 comprende la sustitución de aminoácido 297 con alanina y en la posición 265 en alanina. En determinadas realización, los anticuerpos anti-VEGF-C VC1.12.1, VC1.12.4 y VC1.12.9 comprenden la sustitución de aminoácido en la posición 297 con alanina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF-C VC1.12.1, VC1.12.4 y VC1.12.9 comprenden la sustitución de aminoácido en la posición 297 con alanina y en la posición 365 en alanina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos que comprenden sustituciones de aminoácido en las posiciones 265 y 297 con alanina se denominan "DANA".

Para explorar anticuerpos que se unen a un epítipo particular en el antígeno de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un mapeo epítipo, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés. A continuación se proporcionan realizaciones adicionales ejemplares de anticuerpos anti-VEGF-C.

#### Realizaciones específicas de los anticuerpos anti VEGF-C

25 Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 39 se numeran con respecto a HVR individuales (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1a-f, siendo la numeración coherente con el sistema de numeración de Kabat como se describe en el presente documento.

30 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26.

35 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, y una región HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, y una región HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8, y una región HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, una región HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8, y una región HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26.

45 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende tres de los siguientes aspectos:

- (i) una secuencia de HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3;
- (ii) una secuencia de HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8;
- (iii) una secuencia de HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26.

50 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende tres de los siguientes aspectos:

- (i) una secuencia de HVR-L1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27;
- (ii) una secuencia de HVR-L2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28;
- (iii) una secuencia de HVR-L3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29.

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

60 En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencias de HVR de cadena ligera como se representa en la Figura 1D-F. En una realización, la invención proporciona anticuerpos que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 85 de cadena ligera.

65 En otro aspecto de la invención, en cualquier anticuerpo anti-VEGF-C de la invención descrito en el presente documento, el aminoácido asparragina en la posición 297 se sustituye con el aminoácido alanina. En otra realización, el aminoácido ácido aspártico en la posición 265 se sustituye con el aminoácido alanina. En otra

realización, el anticuerpo comprende adicionalmente secuencias de HVR de cadena ligera como se representa en la Figura 1D-F. En otra realización, el anticuerpo comprende adicionalmente la secuencia SEQ ID NO: 85 de cadena ligera.

5 Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia adecuada de dominio variable de la región marco conservada, siempre que la actividad de unión con VEGF-C se conserve sustancialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consenso de la región marco conservada de cadena pesada del subgrupo III de ser humano. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de la región marco conservada comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En  
10 algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, la 73 es T y/o la 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de la región marco conservada de dominio variable de cadena pesada de huMab4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (a la que también se hace referencia en las patentes de Estados Unidos n.º 6.407.213 y 5.821.337, y en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93). En una realización, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consenso de la región marco  
15 conservada de cadena ligera  $\kappa$  humana.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia de la región marco conservada comprende las secuencias de SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, o 58, y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 3, 8 y 26,  
20 respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia de la región marco conservada comprende las secuencias de SEQ ID NO: 59, 60, 61 y/o 62, y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son las SEQ ID NO: 27, 28 y 29, respectivamente.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite por la unión con VEGF-C con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo en VEGF-C como cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

#### *Fragmentos de anticuerpo*

30 La presente invención incluye fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias el uso de fragmentos de anticuerpo, en vez de anticuerpos enteros, es una ventaja. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede conducir a mejorar el acceso a tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) Nat. Med. 9: 129-134.

35 Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron 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, ahora estos fragmentos pueden producirse directamente en células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse en *E. coli*, permitiendo de este modo facilitar la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las fagotecas de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. En la patente de Estados Unidos n.º 5.869.046 se describen fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con semivida *in vivo* aumentada, que comprenden restos de epítipo de unión al receptor de rescate. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para el experto en la técnica. En determinadas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de Estados Unidos n.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser idóneas para una unión inespecífica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden constuirse proteínas de fusión scFv para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.641.870. Dichos anticuerpos lineales pueden ser  
50 mono-específicos o biespecíficos.

#### *Anticuerpos humanizados*

60 La invención incluye anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener introducido uno o más restos de aminoácido de una fuente que no sea humana. Estos restos de aminoácido no humanos a menudo se denominan restos "importados", que se extraen típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeven *et al.* (1988) Science 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por  
65 consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º

4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, para su uso en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigeneicidad. De acuerdo con el método denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanos conocidas. Después, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la región marco conservada humana para el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901. Otro método utiliza 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. Véase, por ejemplo, Carter *et al.* (1992) *roc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623.

Adicionalmente, en general, es deseable que los anticuerpos se humanicen conservando su alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos de inmunoglobulina tridimensional se encuentran disponibles habitualmente y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar la función probable de los restos durante el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, los análisis de restos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse los restos FR de las secuencias receptoras e importadas de manera que se obtenga la característica deseada del anticuerpo, tal como un aumento de la afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general los restos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados al ejercer influencia en la unión antigénica.

#### *Anticuerpos humanos*

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

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin tener que producir inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH, *heavy-chain joining region*) del anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos produce la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica 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); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse la transposición génica para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", la región variable de la cadena ligera o pesada de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación de fago, como las descritas en el presente documento, se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humano creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con el antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restablece el sitio de unión antigénica destruido después de retirar la cadena no humana correspondiente en el clon primario de presentación de fago, es decir, el epítipo controla (deja su 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 el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injertación de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que tienen restos no FR o CDR de origen no humano.

*Anticuerpos multiespecíficos*

Un ejemplo de un anticuerpo multiespecífico de la presente invención incluye un anticuerpo que se une a VEGF-C y a otro antígeno. En otras realizaciones. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse a dos epítomos de VEGF-C diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan VEGF-C. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a VEGF-C y un brazo que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, una saporina, un anti-interferón- $\alpha$ , un alcaloide de la vinca, una cadena de ricina A, metotrexato o un hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos multiespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

En la técnica se han descrito diversos métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos. Una de estas primeras estrategias implicó la expresión conjunta de dos pares de cadena ligera - cadena pesada de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas pesadas tenían especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la agrupación al azar de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante laboriosa, y los rendimientos del producto son bajos. En el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991) se desvelan procedimientos similares.

De acuerdo con una estrategia diferente, dominios variables de anticuerpo se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones CH2, y CH3. En determinadas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1) está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se transfectan conjuntamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos cuando en las realizaciones las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo es posible insertar las secuencias codificantes en dos o en las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en las mismas proporciones da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen un significado particular.

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

De acuerdo con otra estrategia, la tecnología de "botón en ojal" o "KnH" (*knob into hole*) se refiere a una tecnología que dirige el emparejamiento de dos polipéptidos entre sí *in vitro* o *in vivo* introduciendo una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfaz en la que interactúan. Por ejemplo, se han introducido KnH en las interfaces de unión Fc:Fc, interfaces CL:CH1 o interfaces VH/VL de anticuerpos (por ejemplo, documentos US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.* (1997) *Protein Science* 6: 781-788). Esto es especialmente útil al estimular el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes entre sí durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos que tienen KnH en sus regiones Fc pueden comprender adicionalmente dominios variables sencillos ligados a cada región FC o pueden comprender adicionalmente dominios variables de cadena pesada diferentes que se emparejan con dominios menores de cadena ligera similares o diferentes. De acuerdo con una realización, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean cavidades "compensatorias" de idéntico tamaño o similar en una o más cadenas laterales largas en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos largas con unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo que aumenta el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, y el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos se dirigen, por ejemplo, a células del sistema inmunitario contra células no deseadas (patente de Estados Unidos n.º 4.676.980), y al tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Se conocen agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.676.980).

En la bibliografía también se han descrito técnicas para generar anticuerpos multiespecíficos a 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')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito sódico, un agente formador de complejos ditiol, para estabilizar ditiolos vecinales e impedir la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se transforman después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de TNB-Fab' se reconvierte después en tiol-Fab' por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de TNB-Fab' para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse de *E. coli* y 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')<sub>2</sub> de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' puede secretarse por separado de *E. coli* y someterse a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera puede unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas tumorales de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos 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 complementarios VL y VH de otro fragmento, formando, por lo tanto, dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros F<sub>V</sub> monocatenarios (sFv). Véase Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

#### *Anticuerpos de dominio sencillo*

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio sencillo. Un anticuerpo de dominio sencillo es una cadena polipeptídica sencilla que comprende toda o una parte del dominio variable de cadena pesada o toda o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de dominio sencillo es un anticuerpo de dominio sencillo humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos n.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio sencillo consiste en toda o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

#### *Variantes de anticuerpo*

En algunas realizaciones, se contemplan una o más modificaciones de la secuencia 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 secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácido del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. En el momento de realizar la secuencia pueden introducirse alteraciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo en cuestión.

Un método útil para identificar ciertos restos o regiones del antagonista que sean ubicaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" tal como lo describe Cunningham y Wells Science, 244:10811085 (1989). Aquí, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ej. restos cargados como por ejemplo arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por aminoácidos con carga neutra o negativa (preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas ubicaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en, o por, los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el lugar para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no se necesita predeterminar. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un lugar dado, se realiza el barrido de alanina o

mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se exploran para detectar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxi terminal que abarcan desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más de restos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples restos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, ADEPT) o con un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir el grado al cual se glucosila el anticuerpo. La glucosilación de los polipéptidos es típicamente a través de enlace de tipo N o de tipo O, enlace de tipo N se refiere a la unión de una fracción glucídica a la cadena lateral de un resto de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para las uniones enzimáticas del resto glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido origina un lugar de glucosilación potencial. La glucosilación por enlace de tipo O se refiere a la unión de uno de los azúcares: N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que se crea o elimina una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para lugares de glucosilación unidos por enlace de tipo N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para lugares de glicosilación unidos por enlace de tipo O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido a la misma puede alterarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado, biantenarico que generalmente está unido mediante un enlace N a un Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo Wright *et al.* (1997) TIBTECH 15: 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

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

Las variantes de anticuerpo se proporcionan además con oligosacáridos bisectados, por ejemplo en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está bisectado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); en la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y en el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.) se describen dichas variantes de anticuerpo.

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que adicionalmente mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de restos EU). Dichas sustituciones pueden producirse en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo anti-VEGF-C comprende una región Fc con una sustitución de aminoácido en la posición 297.

5 En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, aunque no todas, las funciones efectoras lo que hace que sea un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En determinadas realizaciones, las actividades Fc del anticuerpo se miden para garantizar que solo se conservan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vivo* y/o *in vitro* para confirmar la reducción/empobrecimiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias que actúan como mediadoras en la ADCC, los linfocitos KN, 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, la página 464, de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). En la Patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83: 7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82: 1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166: 1351-1361 (1987)) se describen ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés. Como alternativa pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y los linfocitos citolíticos naturales (*Natural Killer cells*). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y que por tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); y Cragg, M. S. y M. J. Glennie, *Blood* 103: 2738-2743 (2004)). Las determinaciones de unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* también pueden llevarse a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo Petkova, S. B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácido. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 debajo del encabezado "sustituciones preferidas". En la Tabla 1 se proporcionan cambios más sustanciales denominados "sustituciones ejemplares", o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de aminoácidos. En un anticuerpo de interés pueden introducirse sustituciones de aminoácidos y los productos pueden explorarse, por ejemplo, con respecto a una actividad deseada, tal como unión antigénica mejorada, inmunogeneidad disminuida, ADCC o CDC mejoradas, etc.

40 TABLA 1

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
He (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

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Phe (F)	Trp; Leu; Val; He; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden realizarse seleccionando sustituciones que afectan (a) a la estructura de la cadena polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) a la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) al volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., páginas 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

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

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades comunes de la 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;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas supondrían intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para un posterior desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generaron. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación de fagos. De manera resumida, diversos sitios de la región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se presentan a partir de partículas de fago filamentosos como fusiones en al menos parte de una proteína de recubrimiento de fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetado con cada partícula. Después las variantes presentadas en fagos se exploran con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis de barrido (por ejemplo, barrido con alanina) para identificar restos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión al antígeno. De manera alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluyendo las elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a exploración, usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo las descritas en la presente memoria descriptiva y se pueden seleccionar los variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para un posterior desarrollo.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que aparezcan naturalmente) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis dirigida mediante PCR y mutagénesis por inserción de un cassette de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo.

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

De acuerdo con esta descripción y con las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos de ningún modo conservarán sustancialmente las mismas características necesarias para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se piensa que pueden realizarse determinadas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q alterada (es decir o mejorada o disminuida) y/o una Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); Patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; Patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y documento WO94/29351 en relación a otros ejemplos de las variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada con el receptor Fc neonatal (FcRn) que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en su interior que mejora la unión de la región Fc con FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas en la región Fc y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.194.551B1, WO99/51642. Véase también Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en el que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de complejos del primer y segundo polipéptido Fc. En la técnica se conocen métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.731.168.

En otro aspecto adicional, puede ser deseable crear anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, "thioMAbs", donde uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo aquellos sitios con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otras fracciones, tales como fracciones farmacológicas o fracciones fármaco-enlazador, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas realizaciones, cualquiera de uno o más de los siguientes restos pueden sustituirse por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

#### *Derivados de anticuerpo*

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse también para que contengan fracciones no proteicas adicionales conocidas y disponibles en la técnica. Preferentemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Como ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles se incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero 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 prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si están unidos más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros que se usan para la derivatización puede determinarse basándose en cuestiones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y fracciones no proteicas que pueden calentarse selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no calientan células normales, pero que calientan la fracción no proteica a una temperatura a la cual las células próximas a la fracción no proteica del anticuerpo se destruyen.

### Inmunconjugados

La invención también proporciona inmunconjugados (denominados indistintamente "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC, *antibody-drug conjugates*") que comprenden un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los inmunconjugados se han utilizado para la liberación local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben el crecimiento o la proliferación de células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opin. in Pharmacology* 5: 543-549; Wu *et al* (2005) *Nature Biotechnology* 23 (9): 1137-1146; Payne, G. (2003) *ibid* 3: 207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26: 151-172; patente de Estados Unidos n.º 4.975.278). Los inmunconjugados permiten la liberación dirigida de una fracción farmacológica a un tumor, y la acumulación intracelular en su interior, en el que la administración sistémica de los fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad a las células normales, así como contra las células tumorales que se desean eliminar (Baldwin *et al.*, *Lancet* (Mar. 15, 1986) pags. 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.*, eds) pags. 475-506. 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) citado anteriormente). Las toxinas que se usan en 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) *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573-1581; Mandler *et al* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), y calicamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o con ligandos de receptores proteicos.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos normales y B malignos y el radioisótopo  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$  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 ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a calicamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25 (7): 686; patentes de Estados Unidos n.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado mediante el enlazador disulfuro SPP a la fracción farmacológica de maitansinoide, DM 1, se está desarrollando en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cáncer de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, *prostate specific membrane antigen*) ligado a la fracción farmacológica de maitansinoide, DM1, está en desarrollo 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 cAC10 (específico contra CD30 en neoplasias hematológicas) (Doronina *et al* (2003) *Nature Biotechnol.* 21 (7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En determinadas realizaciones, un inmunconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. En el presente documento (por ejemplo, anteriormente) se describen agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena de la difteria A, fragmentos activos no unión de la toxina diftérica, cadena de endotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina 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, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Para la producción de anticuerpos radioconjugados se dispone de diversos radionúclidos. Los ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , y  $^{186}\text{Re}$ . Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), 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-diazono (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmuntoxina de ricina como se describe en

Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminapentaacético marcado (MX-DTPA) con carbono 14, es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación de radionúclidos con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

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

#### *Maitansina y maitansinoides*

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

- 15 Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (patente de Estados Unidos n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que algunos microbios también producen maitansinoides, tales como el maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de Estados Unidos n.º 4.151.042). También se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos de los mismos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 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; 20 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; and 4.371.533.

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

- 30 Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos de preparación de los mismos, y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 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 DM 1 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.*, Cáncer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado maitansinoide-TA.1 se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que podía aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

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

- 55 Para la fabricación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide hay muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cáncer Research 52: 127-131 (1992), y en la solicitud de patente U.S. n.º 10/960,602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se desvela en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 10/960,602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles o grupos esterasa lábiles, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter. En el presente documento se describen y se ilustran grupos enlazadores adicionales.

- 65 Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide pueden prepararse usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (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-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) 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 la molécula de 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, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un 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.º 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al.* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965). La fracción farmacológica de dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o del extremo C (carboxilo) de la fracción farmacológica peptídica (documento WO 02/088172).

Las realizaciones ejemplares de auristatina incluyen el extremo N ligado a fracciones farmacológicas de monometilauristatina DE y DF, desveladas en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983, 340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

Típicamente, pueden prepararse fracciones farmacológicas basadas en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química peptídica. Las fracciones farmacológicas de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos indicados en los documentos: US 5635483; US 5780588; Pettit *et al.* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit *et al.* (1998) Anti-Cáncer 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", US Ser. n.º 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

#### *Calicamicina*

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un conjugado de anticuerpo con una o más moléculas de calicamicina. La familia de antibióticos de la calicamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicamicina, 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 American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la calicamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación,  $\gamma$ 11,  $\alpha$ 21,  $\alpha$ 31, N-acetil- $\gamma$ 11, PSAG y  $\theta$ 11 (Hinman *et al.*, Cáncer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cáncer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de la American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que puede conjugarse con el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan realmente 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 agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoizotocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida grupalmente 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 sus fragmentos, que pueden utilizarse incluyen cadena de la difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina 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, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

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

10 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Se dispone de diversos isotopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo,  $^{99m}Tc$  o  $I^{123}$ , o un marcador de spin para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tales como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

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

25 Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)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-diazono (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación de radionúclidos 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 ácido lábil, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cáncer Research 52:127-131 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5,208,020).

40 Los compuestos contemplan expresamente, pero sin limitación, conjugados de anticuerpo - fármaco, ADC, preparados con reactivos de reticulación: 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). Véase las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

#### 45 *Preparación de conjugados de anticuerpo con fármaco*

50 En los conjugados de anticuerpo - fármaco (ADC, *antibody drug conjugate*), un anticuerpo (Ab) se conjuga con una o más fracciones farmacológicas (D, *drug*), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 fracciones farmacológicas por anticuerpo, a través de un enlazador (L, *linker*). El ADC de Fórmula I puede prepararse mediante diversas vías, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la técnica, entre los que se incluye: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido por reacción con una fracción farmacológica D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de una fracción farmacológica 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 la preparación de ADC.



60 El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-fe"), p-aminobenziloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y N-succinimidil (4-yodo-acetil) 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", US Ser. n.º 10/983,340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

65

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácido. Los componentes enlazadores de aminoácido ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los tripéptidos 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 aminoácido que comprenden un componente enlazador de aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácido de origen no natural, tales como citrulina. También pueden diseñarse y optimizarse componentes enlazadores de aminoácido en cuanto a su selectividad para la escisión enzimática mediante enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D o una plasmina proteasa.

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en el que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetonas, carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos tienen enlaces disulfuro intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o en un fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácido cisteína no naturales).

También pueden producirse conjugados de anticuerpo - fármaco por modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrófilas, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco enlazador. Los azúcares de los 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 los reactivos enlazadores o fracciones farmacológicas enlazadoras. 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 de hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato de sodio 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 tionina en N terminal pueden reaccionar con metaperyodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con una fracción farmacológica o un nucleófilo enlazador.

Del mismo modo, los grupos nucleófilos en una fracción farmacológica incluyen, pero sin limitación: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiocarbazona, carboxilato de hidrazina, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetonas, carboxilo y maleimida.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo mediante 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 separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

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

*Determinados métodos para la preparación de anticuerpos*

*Determinados métodos basados en hibridoma*

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), y descrito posteriormente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006) en lo que respecta a hibridomas de ser humano- ser humano. Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 7.189.826 en lo que respecta a la producción de anticuerpos monoclonales de IgM naturales de ser humano, para líneas de células de hibridoma.

La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3): 927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3): 185-91 (2005).

5 Para diversas otras técnicas de hibridoma véanse, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las patentes de Estados Unidos n.º 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ejemplar para la producción de anticuerpos monoclonales que usa el método de hibridoma se describe de la siguiente manera. En una realización, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para suscitar linfocitos que producen o que  
10 pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína que se utiliza para la inmunización. Los anticuerpos se generan en los animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende VEGF-C o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende VEGF-C o un fragmento del mismo puede prepararse utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento.  
15 El suero de los animales inmunizados se ensaya para determinar la presencia de anticuerpos anti-VEGF-C y se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Los linfocitos de los animales que producen los anticuerpos anti-VEGF-C se aíslan. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

20 Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pags. 59-103 (Academic Press, 1986). Pueden usarse células de mieloma que se fusionan de un modo eficaz, y dan soporte a una producción estable, a alto nivel, del anticuerpo mediante células productoras de anticuerpos, y que son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero sin limitación, líneas de mieloma murino, tales como las procedentes de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11  
25 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California Estados Unidos, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland Estados Unidos. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromiéloma humano- ratón 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*, pags. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).  
30

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban 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 típicamente  
35 incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células deficitarias en HGPRT. Preferentemente, se usan métodos de cultivo asérico de células de hibridoma para reducir el uso de suero procedente de animales, tal como suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 105-108 (2006).  
40

En Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005) se describen oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma. Específicamente, los medios de cultivo convencionales se enriquecen con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), o con fracciones de hidrolizados de proteína y la apoptosis puede suprimirse significativamente con oligopéptidos  
45 sintéticos, constituidos por restos de tres a seis aminoácidos. Los péptidos están presentes a concentraciones milimolares o más altas.

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma puede ensayarse con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a VEGF-C. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales  
50 producidos por células de hibridoma puede determinarse 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 análisis Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

55 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Goding, citado anteriormente. Los medios de cultivo adecuados para esta finalidad incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones  
60 se separan adecuadamente del medio de cultivo, del fluido ascítico o del suero, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para aislar proteínas de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y en la patente de Estados Unidos n.º 6.919.436. El método incluye el uso de sales mínimas, tal como sales liotrópicas, en el proceso de unión y  
65 preferentemente también usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

*Determinados métodos de exploración de bibliotecas*

Los anticuerpos de la invención pueden fabricarse usando bibliotecas combinatorias para explorar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para generar bibliotecas de presentación de fagos y exploración de dichas bibliotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos se describen en líneas generales en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un método para generar anticuerpos de interés es a través del uso de una biblioteca de anticuerpos en fagos, como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340 5): 073-93.

En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan explorando fagotecas que contengan fagos que presenten diversos fragmentos de la región variable (Fv) del anticuerpo fusionado a la proteína de recubrimiento del fago. Dichas fagotecas se seleccionan mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y por tanto se separan de los clones no unidos en la biblioteca. Los clones de unión se diluyen después del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/ elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de exploración de antígeno adecuado para seleccionar el clon del fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias Fv del clon del fago de interés y las secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de ellas de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentado ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse funcionalmente en el fago, bien como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que las cadenas VH y VL están ligadas de manera covalente a través de un péptido corto, flexible o como fragmentos Fab, en los que cada uno de ellos se fusiona con un dominio constante e interacciona de manera no covalente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan en su conjunto "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes VH y VL pueden clonarse individualmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en fagotecas, que después pueden investigarse con respecto a clones de unión a antígeno, como se describe en 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 virgen puede clonarse para proporcionar una sola fuente de anticuerpos humanos contra una amplia variedad de no autoantígenos y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden fabricarse bibliotecas vírgenes de manera sintética, clonando los segmentos de gen V no reordenados de células madre y usando cebadores de PCR que contengan secuencias al azar que codifiquen las regiones CDR3 altamente variables y logren la reordenación *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En determinadas realizaciones, se usan fagos filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión con la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde el ensamblaje de una estructura proteica de recubrimiento - Fab comienza a presentarse en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de recubrimiento de tipo silvestre, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Ácidos 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-VEGF-C, el sujeto se inmuniza con VEGF-C para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan esplenocitos y/o linfocitos B circulantes distintos de linfocitos de sangre periférica (LSP) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano sesgada a favor de clones anti-VEGF-C se obtiene generando una respuesta de anticuerpos anti-VEGF-C en ratones transgénicos que llevan una matriz génica de inmunoglobulina humana funcional (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcional) de tal manera que la inmunización con VEGF-C genera linfocitos B que producen anticuerpos humanos contra VEGF-C. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional de poblaciones de células reactivas anti-VEGF-C puede obtenerse usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar linfocitos B que expresen anticuerpos unidos a membrana específicos de VEGF-C, por ejemplo, mediante separación celular usando una cromatografía de afinidad para

VEGF-C o adsorción de células a VEGF-C marcado con fluorocromo seguido por separación de células activadas con fluorescencia (FACS).

5 Como alternativa, el uso de esplenocitos y/o linfocitos B u otros LSP de un donante no inmunizado, proporciona 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 VEGF-C no sea antigénico. Para bibliotecas que incorporan una construcción génica de anticuerpos *in vitro*, se extraen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse de diversas especies de animales, tales como, ser humano, ratón, rata, especies de lagomorfos, luprinos, caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos y de aves, etc.

15 El ácido nucleico que codifica los segmentos génicos variables (incluyendo los segmentos VH y VL) de un anticuerpo, se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reordenadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando de linfocitos ADN genómico o ARNm, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se aparean con los extremos 5' y 3' de genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), mediante lo cual se fabrican diversos repertorios de genes V para su 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 con cebadores directos basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para la amplificación de ADNc, los retrocebadores también pueden basarse en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en 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). En determinadas realizaciones, la diversidad de las bibliotecas se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos contra cada una de las familias del gen V para amplificar todas las disposiciones VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmunitaria, por ejemplo, como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, Nucleic Ácidos Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en los vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de PCR como una etiqueta en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o por amplificación con PCR adicional como un cebador con etiqueta como describen Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

35 Los repertorios de genes V sintéticamente reordenados pueden proceder *in vitro* de segmentos génicos V. La mayoría de los segmentos génicos VH humanos se han clonado y secuenciado (como se describe en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y se han construido mapas (como se describe 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 H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden prepararse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencias centrada en un largo bucle H3 de una sola longitud como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos V<sub>K</sub> y V<sub>L</sub> humanos se han clonado y secuenciado (como se describe en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de gen V sintético, basados en una serie de pliegues VH y VL y de longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN que codifican el gen V, los segmentos del gen V de la línea germinal pueden reordenarse *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

50 Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando entre sí repertorios génicos VH y VL de diversas maneras. Cada repertorio puede crearse en vectores diferentes, y los vectores pueden recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, Nucl. Ácidos 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 la transformación de *E. coli*. Los repertorios VH y VL vírgenes se clonan individualmente, uno en un fagémido y 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 se limita únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10<sup>12</sup> clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de tal manera que los genes VH y VL se recombinan en un solo replicón y se empaquetan conjuntamente en viriones de fago. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes cantidades de diversos anticuerpos de buena afinidad (K<sub>d</sub><sup>-1</sup> de aproximadamente 10<sup>-8</sup> M).

65 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 entre sí por PCR y después clonarse, por ejemplo, como se describe en 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 monocatenario (scFv). En otra técnica más, se usa "ensamblaje por PCR en la célula"

para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y después repertorios de clones de genes ligados como se describe en Embleton *et al.*, Nucl. Ácidos Res., 20: 3831-3837 (1992).

5 Los anticuerpos producidos por bibliotecas vírgenes (naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$   $M^{-1}$ ), pero la maduración por afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y re seleccionando de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), citado anteriormente. Por ejemplo, puede introducirse una mutación al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a error (como se describe 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). De manera adicional, puede realizarse  
10 maduración por afinidad mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que llevan una secuencia al azar que contiene la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y explorar clones de alta 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 es recombinar los dominios VH o VL  
15 seleccionados por presentación de fagos con repertorios de variantes del dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorar la alta afinidad en diversas rondas de retransposición de cadenas como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente  $10^9$  M o más bajas.

20 La exploración de las bibliotecas puede realizarse mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, puede usarse VEGF-C para revestir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en separación celular, o conjugarse con biotina para capturar perlas revestidas con estreptavidina, o usarse en cualquier otro método de selección de bibliotecas de presentación en fagos.

25 Las muestras de fagotecas se ponen en contacto con VEGF-C inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares, se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen con ácidos, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o con bases, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o mediante competición de antígeno VEGF-C, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-  
30 1.000-veces en una sola ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden crecer en cultivos bacterianos y someterse a rondas de selección posteriores.

35 La eficiencia de la selección depende de muchos factores, entre los que se incluyen los parámetros de disociación cinética durante el lavado y si los fragmentos múltiples de anticuerpos en un solo fago pueden acoplarse simultáneamente con un antígeno. Los anticuerpos con parámetros cinéticos de disociación rápidos (y débiles afinidades de unión) pueden conservarse con el uso de lavados cortos, presentación de fagos multivalente y con una alta densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de  
40 interacciones multivalentes, sino que favorece la re-unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con parámetros cinéticos de disociación lentos (y buenas afinidades de unión) puede promoverse con el uso de lavados prolongados y presentación de fagos monovalente como se describe en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y con una baja densidad de recubrimiento del antígeno, como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

45 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para VEGF-C. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración por afinidad) probablemente produce muchos mutantes, que se unen mayoritariamente al antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con los VEGF-C limitantes, pueden competir fagos de alta afinidad poco habituales. Para conservar todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con VEGF-C biotinilado en exceso, pero con el VEGF-C biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana para VEGF-C. Los fagos de unión con alta afinidad pueden después capturarse con perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones  
50 mutantes con una afinidad de tan solo dos veces más alta de un exceso mayor de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar en función de los parámetros cinéticos de disociación.

60 Los clones anti-VEGF-C pueden seleccionarse en función de la actividad. En determinadas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF-C que se unen a células vivas que expresan VEGF-C de manera natural. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF-C que bloquean la unión entre un ligando de VEGF-C y VEGF-C, pero no bloquean la unión entre un ligando de VEGF-C y una segunda proteína. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-VEGF-C pueden seleccionarse (1) aislando clones anti-VEGF-C de una fagoteca como se describe anteriormente y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos haciendo crecer la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) seleccionando VEGF-C y una  
65 segunda proteína contra la cual se desea actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo

los clones de fagos anti-VEGF- C en VEGF-C inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a VEGF-C que se solapan o comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/ no bloqueantes deseadas pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones Fv de presentación de fagos de la invención se aísla y se secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés del hibridoma o molde de ADN del fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse 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 manera no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención 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.*, citado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas ligeras y/o pesadas de longitud completa o parcial. 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 cualquier especie animal o de ser humano. Un clon de Fv procedente de ADN del dominio variable de una especie animal (tal como de un ser humano) y después se fusiona con ADN de región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias codificantes para una cadena ligera y/o cadena pesada de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En determinadas realizaciones, un clon Fv procedente de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humana para formar una o más secuencias codificantes para las cadenas ligeras y/o pesadas humanas de longitud parcial o completa.

El ADN que codifica un anticuerpo anti-VEGF-C procedente de un hibridoma de la invención también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y cadena 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 de un clon de hibridoma Fv puede modificarse adicionalmente mediante unión covalente con la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda la secuencia codificante, o parte de ella, de un polipéptido de inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos procedentes del clon Fv o del clon de hibridoma de la invención.

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

Los anticuerpos también pueden producirse usando métodos recombinantes. Para la producción recombinante de anticuerpo anti-VEGF-C, se aísla e inserta el ácido nucleico en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Se dispone de muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia terminadora de la transcripción.

#### Componente de secuencia de señal

Un anticuerpo de la invención puede producirse de manera recombinante no solamente directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que preferentemente es una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan una secuencia de señal de anticuerpo natural, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o de enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levaduras, la secuencia de señal nativa puede sustituirse por ejemplo por el líder de invertasa de levadura, el líder de factor  $\alpha$ , incluyendo líderes de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces kluyveromyces*, o un líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, hay disponibles secuencias de señal de mamífero así como líderes virales secretores, por ejemplo, la señal gD del virus del herpes simple.

Origen de replicación

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son muy conocidas para una variedad de 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 $\mu$  es adecuada para levaduras y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen del SV40 puede usarse típicamente solamente porque contiene el promotor temprano).

Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, denominado también marcador de selección. 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) deficiencias auxotróficas del complemento o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman de manera satisfactoria 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 de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar ácido nucleico que codifica el anticuerpo tal como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de la DHFR se identifican cultivando las transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen de la DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico transformado. Puede usarse una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR endógena (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

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

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadoras de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen DHFR de tipo silvestre y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) puede seleccionarse mediante el crecimiento de células en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

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)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el cultivo en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

Además, los vectores procedentes del plásmido circular de 1.6  $\mu$ m pKD1 puede usarse para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Como alternativa, se comunicó un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión multicopia adecuados para la secreción de albúmina de suero humana recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación generalmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor de *phoA*,  $\beta$ -lactamasa y sistemas promotores de lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son idóneos otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica un anticuerpo.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases cadena arriba desde el 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 es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias de promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato 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 para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero puede controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como poliovirus, virus de la viruela, adenovirus (tales como adenovirus 2) papiloma virus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus 40 de simio (SV40), o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico proporcionados siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para la expresión de ADN en hospedadores de mamífero usando el papilomavirus bovino como un vector se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión del ADN del  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, como promotor también puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, típicamente, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Como ejemplo se incluye el potenciador SV40 del lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) o 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 codificante del anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' desde el promotor.

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células de hospedadores eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, ser humano o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles normalmente a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3' de los ADN o ADNc eucariotas o de virus. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de

poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase el documento WO94/1102 y el vector de expresión desvelado en su interior.

#### Selección y transformación de células hospedadoras

5 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento son células procariotas de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Las procariotas adecuadas para esta finalidad incluyen eubacterias tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*,  
10 *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, 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*. Un hospedador de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como la cepa B de *E. coli*, la cepa X1776 de *E. coli* (ATCC 3.537), y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son  
15 ilustrativos en lugar de limitantes.

En bacterias pueden producirse anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión con anticuerpo y fragmentos de anticuerpo, en particular cuando la glucosilación y la función efectora Fc no sean necesarias, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que en sí mismo muestra  
20 efectividad en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.648.237 (Carter et. al.), U.S. 5.789.199 (Joly et al.), U.S. 5.840.523 (Simmons et al.), que describen la región de inicio de la traducción (TIR, *translation initiation region*) y secuencias de señal para optimizar la expresión y secreción. Véase también Charlton,  
25 *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas 245-254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse del concentrado celular de *E. coli* en un fragmento soluble y puede purificarse a través de por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede realizarse de manera similar al proceso para la purificación de anticuerpos expresados por ejemplo en células CHO.

30 Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de expresión o clonación adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común del panadero es el organismo hospedador eucariota inferior más habitualmente usado. Sin embargo, diversos otros géneros, especies y cepas son comúnmente disponibles y útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis*  
35 (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii*(ATCC 24,178), *K. waltii*(ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwannomyces* tales como *Schwannomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*,  
40 *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para un análisis de revisión del uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004).

Pueden seleccionarse determinados hongos y cepas de levadura en los que las rutas de glucosilación se han  
45 "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li et al., *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross et al., citados anteriormente.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados también proceden de  
50 organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de báculo virus y variantes y células hospedadoras de insectos permisivos correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Se dispone de una diversidad de cepas de virus para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de planta de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (*Lemnaceae*),  
60 alfalfa (*M. truncatula*), y tabaco también pueden utilizarse como hospedadores. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados pueden usarse como hospedadores y la propagación de células de vertebrados en  
65 cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 renal de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivos de

suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, 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 humana (Hep G2). Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células de DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas 255-268.

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión 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, transformantes de selección o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

#### Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras que se usan para producir un anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles en el comercio tales como medio esencial mínimo de Ham's F10 (Sigma) (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado de 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), patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30.985 pueden usarse como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, de calcio, de magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía similar. Cualquier otro complemento necesario también puede incluirse a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente utilizadas dentro de la célula hospedadora seleccionada para la expresión y será obvia para el experto habitual en la técnica.

#### Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico o directamente secretarse en el medio. Si en anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos particulados bien células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultra centrifugación. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, el concentrado celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3.5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. 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 ultra filtración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes inesperados.

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

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

5 En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayos e investigación clínica están bien establecidas en la técnica, coherentes con las metodologías descritas anteriormente y/o que se consideran apropiadas por un experto en la técnica para un anticuerpo de interés particular.

#### 10 Formulaciones y dosificaciones farmacéuticas

La composición de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen, sin limitación, el trastorno particular que vaya a tratarse, el mamífero particular que vaya a tratarse, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el lugar de liberación del agente, el método de administración, el régimen de administración y otros factores conocidos por los médicos. Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa en solitario o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos) dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y del transcurso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra idóneamente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos.

25 Las formulaciones farmacéuticas del presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que vaya a tratarse, preferentemente aquellas que tienen actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Dichas moléculas están idóneamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito deseado.

30 La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrar la regirán las consideraciones analizadas anteriormente y es la cantidad mínima necesaria para impedir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo no tiene que formularse necesariamente, aunque es opcional, con uno o más agentes normalmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores indicados anteriormente. Estos generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con días de administración como las que se usan anteriormente en el presente documento o de aproximadamente 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora. Generalmente, el alivio o el tratamiento de una enfermedad o trastorno implican aminorar uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco que puede conseguir una o una combinación de lo siguiente: reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto grado y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Hasta el grado en el que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas realizaciones, puede usarse una composición del presente documento para prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

45 En determinadas realizaciones, dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones distintas, o mediante infusión continua. En otra realización, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg- 10 mg/kg) del anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente. Una dosificación diaria típica variaría de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se prolonga hasta que se produzca la supresión de los síntomas de la enfermedad deseados.

55 Una dosificación ejemplar de anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Por tanto, puede administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada día, cada tres días, una vez a la semana o cada dos a tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis de anticuerpo). En una realización, la dosis de aproximadamente 10 mg/kg se administra cada tres días. Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis inferiores. En una realización, un régimen de dosificación ejemplar comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

En determinadas realizaciones, los regímenes de dosificación indicados en el presente documento se usan en combinación con anticuerpo anti-VEGF y/o un régimen de quimioterapia como una terapia de primera línea para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia implica la administración intermitente de alta dosis tradicional. En algunos aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis más pequeñas y más frecuentes sin descansos programados (“quimioterapia metronómica”).

El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente mediante infusión por pulsos, particularmente con disminución de la dosis del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tal como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte o de si la administración de breve o crónica.

La localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede considerarse en la preparación y administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión de un anticuerpo se localiza en el cerebro, determinadas realizaciones de la invención proporcionan que el anticuerpo atraviese la barrera hematoencefálica. Existen diversas estrategias conocidas en la técnica para el transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica, entre las que se incluyen, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, evadir totalmente la barrera hematoencefálica o creando aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de circunvención incluyen, pero sin limitación, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), liberación intersticial potenciada por infusión/convección (véase, por ejemplo, Bobo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994)), e implante de un dispositivo de liberación en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos de creación de aberturas en la barrera incluyen, sin limitación, ultrasonido (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, volúmenes 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o el permeabilizador A-7 (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que se extienden sobre la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2003/0083299).

Los métodos de transporte de un anticuerpo basados en lípidos a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsulación del anticuerpo en liposomas que están acoplados a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20020025313), y recubrimiento del anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040204354) o de apolipoproteína E (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040131692).

Los métodos de transporte de un anticuerpo basados en células madre a través de la barrera hematoencefálica conllevan la modificación genética de células progenitoras neuronales (NPC) que expresan el anticuerpo de interés y después implantan las células madre en el cerebro del individuo que va a tratarse. Véase Behrstock *et al.* (2005) *Gene Ther.* 15 de diciembre de 2005, avance de la publicación en línea (que comunica que las NPC modificadas por ingeniería genética para expresar el factor neurotrófico GDNF rejuderon los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantaron en los cerebros de modelos de roedor y de primate).

Los métodos de transporte de un anticuerpo basados en receptores y canales a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, el uso de bloqueantes glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la a través de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de las solicitudes de patente de Estados Unidos n.º 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); canales de activación de potasio (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0089473), inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0073713); anticuerpo de recubrimiento con una transferrina y modulación de la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0129186), y cationización de los anticuerpos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,004,697).

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con transportadores, excipientes o

estabilizantes 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 transportadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); 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, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono 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 proteínas de Zn); y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los principios activos también pueden quedar atrapados en micro capsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli(metil metacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, micro esferas de albúmina, micro emulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macro emulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000).

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o alcohol polivinílico), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glucónico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (micro esferas inyectables compuestas copolímero de ácido láctico-ácido-glucónico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros, tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glucónico 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 cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado, estas pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Para la estabilización pueden contemplarse estrategias lógicas dependiendo del mecanismo que intervenga. Por ejemplo, si se descubre el mecanismo de agregación que es intermolecular por la formación de enlaces S-S a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede realizarse modificando los restos sulfidrílo, liofilizando a partir de soluciones acidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

#### Métodos

La invención proporciona adicionalmente métodos, kits y artículos de fabricación para modular (por ejemplo, inhibir) procesos implicados en la linfangiogénesis y angiogénesis y para su uso en el direccionamiento de afecciones patológicas asociadas con la linfangiogénesis y angiogénesis tales como cáncer.

La terapia antiangiogénica en relación con cáncer es una estrategia de tratamiento del cáncer cuyo objetivo es inhibir el desarrollo de los vasos sanguíneos tumorales necesarios para proporcionar nutrientes para soportar el crecimiento tumoral. Dado que la angiogénesis está implicada tanto en el crecimiento del tumor primario como de la metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado por la invención puede inhibir el crecimiento neoplásico de tumores en el sitio primario así como prevenir la metástasis de tumores en sitios secundarios, de este modo permitiendo el ataque de los tumores por otros agentes terapéuticos.

Por consiguiente, la invención incluye métodos para inhibir la angiogénesis usando una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-C (tales como un anticuerpo anti-VEGF-C o una inmunoadesina de VEGF-C) para inhibir la activación por VEGF-C de receptores de VEGF-C (tales como VEGFR3 y VEGFR2). En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la linfangiogénesis que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-C a un sujeto que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF-C puede inhibir la migración de células endoteliales LEC, proliferación y/o inhibición de la dispersión de LEC. En otra realización, la invención proporciona métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales CELy/o inhibir la migración de células endoteliales CEL que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-C y un antagonista de VEGF-A a un sujeto que necesite dicho tratamiento. En una realización, el antagonista de VEGF-C es el anticuerpo anti-VEGF-C y el antagonista de VEGF-A es el anticuerpo anti-VEGF-A. En otra realización adicional, en anticuerpo anti-VEGF-A es bevacizumab.

*Métodos terapéuticos*

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

- 5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento o prevención de un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un trastorno asociado con la expresión y/o actividad aumentada de VEGF-C) que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-C a un sujeto que necesite dicho tratamiento.
- 10 En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear o prevenir el crecimiento de un tumor o cáncer, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-C a un sujeto que necesite dicho tratamiento.
- 15 En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis que comprenden administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-C a un sujeto que necesite dicho tratamiento.
- 20 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección patológica asociada con angiogénesis que comprenden administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-C a un sujeto que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular.
- 25 Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un ser humano para fines terapéuticos. En una realización, un anticuerpo de la invención se usa en un método para unir VEGF-C en un individuo que padece un trastorno asociado con la expresión y/o actividad aumentada de VEGF-C. Comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo de tal manera que el VEGF-C está unido. En una realización, el VEGF-C es VEGF-C humano, y el individuo es un individuo humano. Como alternativa, el individuo puede ser un mamífero que exprese VEGF-C al cual se une un anticuerpo de la invención. Adicionalmente un individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido VEGF-C (por ejemplo, mediante la administración de VEGF-C o por expresión de un transgen que codifica VEGF-C).
- 30 En un aspecto, al menos alguno de los anticuerpos de la invención puede unirse a VEGF-C de especies distintas de ser humano. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para unir actividad específica de antígeno por ejemplo, en un cultivo celular que contenga el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tengan el antígeno con el cual un anticuerpo de la invención reacciona en cruzado (por ejemplo, chimpancé, babuino, mono tití, mono cinomolgo y resus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención puede usarse para la inhibición de actividades de antígeno poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno de tal manera que la actividad del antígeno se inhibe. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.
- 35 Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que exprese VEGF-C con el que reacciona en cruzado en anticuerpo (por ejemplo, un primate, un cerdo, una rata o un ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Considerando lo anterior, dicho modelo animal puede ser útil para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y evolución de la administración).
- 40 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retrasar la progresión de, prevenir, retrasar la recurrencia de, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad de una o más moléculas de antígeno.
- 45 La presente invención también incluye la prevención y el tratamiento de linfangiogénesis tumoral, la prevención y el tratamiento de metástasis tumoral y la terapia antiangiogénica del cáncer, una nueva estrategia de tratamiento contra el cáncer destinado a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales necesarios para proporcionar nutrientes para dar soporte al crecimiento del tumor.
- 50 La invención incluye específicamente la inhibición del crecimiento neoplásico del tumor en el sitio primario así como la prevención y/o tratamiento de metástasis de tumores en los sitios secundarios, por lo tanto permitiendo el ataque a los tumores por otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de cáncer a tratar (incluyendo prevención) del presente documento incluyen, pero sin limitación, cánceres proporcionados en el presente documento bajo las definiciones tales como carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de celular escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer estromal gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar,
- 55
- 60
- 65

5 cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma maligno lentigo, melanoma lentiginoso acral, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin (LNH) de grado bajo/ folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/ folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH con enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPP), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como es asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro así como de cabeza y

10 cuello y metástasis asociadas. En determinadas realizaciones, los cánceres son susceptibles al tratamiento por los anticuerpos de la invención que incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, glioblastoma, linfoma no-Hodgkin (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinoideo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que

15 consiste en cáncer pulmonar microcítico, glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), y carcinoma hepatocelular. Incluso, en algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de ovario, glioblastoma y carcinoma de mama, incluyendo formas metastásicas de estos cánceres.

20 La invención incluye específicamente además la prevención y/o tratamiento de afecciones no neoplásicas. Las afecciones no neoplásicas que son susceptibles al tratamiento con antagonistas útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, psoriasis en placas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, edema de infarto de miocardio, retinopatías proliferativas diabéticas y otras incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de córnea, neovascularización de injerto de córnea, rechazo de injerto de córnea, neovascularización de la retina/coroides, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de

25 Grave), trasplante de tejido corneal y otros, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión de pulmón aguda/ ARDS, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado con ictus agudo/ lesión de cabeza cerrada/ traumatismo), inflamación sinovial, formación de panus en AR, moisitis osificante, formación de hueso hipertrófico, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades del 3<sup>er</sup> espacio de fluido (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica tal como IBD

30 (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento de masa tisular no deseada o aberrante (no cancerosa), obesidad, crecimiento masivo de tejido adiposo, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del peso, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolentales de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada con pericarditis), y derrame pleural.

Otros ejemplos de trastorno a tratar con un antagonista de VEGF-C (tal como un anticuerpo anti-VEGF-C) incluyen un trastorno epitelial o cardíaco.

45 Se entiende que los métodos terapéuticos descritos en el presente documento pueden realizarse usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además del anticuerpo anti-VEGF-C. En determinadas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al cual está unido se internaliza en la célula dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula diana a la cual se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. En una realización, el agente citotóxico se dirige o interfiere con la polimerización de microtúbulos. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos observados en el presente documento (tal como un maitansinoide, auristatina, dolastatina, o una caliceamicina), un isótopo radiactivo o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

55 *Terapias de combinación*

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en solitario o en combinación con otras composiciones en una terapia. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional y/o un adyuvante. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF-C de la invención puede coadministrarse con otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF-C), uno o más agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), otros agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, citocinas y/o agentes inhibidores del crecimiento.

65 Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, esto puede ser particularmente deseable para combinarlo con uno o más agentes terapéuticos distintos que también inhiben el crecimiento del tumor, por ejemplo,

agentes antiangiogénicos y/o agentes quimioterapéuticos. Típicamente, los anticuerpo anti-VEGF-Cs y los agentes contra el cáncer son adecuados para las mismas o similares enfermedades para bloquear o reducir un trastorno patológico tal como un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular. En una realización, los anticuerpos anti-VEGF-C pueden usarse en combinaciones con terapias contra el cáncer o terapias antineovascularizantes para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas. Como alternativa, o adicionalmente, los anticuerpos anti-VEGF-C pueden usarse en combinaciones con otros inhibidores de VEGF-C. En una realización, la afección neoplásica o no neoplásica se caracteriza por un trastorno patológico asociado con angiogénesis aberrante o no deseada. En otra realización el agente contra el cáncer es un agente antiangiogénico.

Se han identificado y se conocen en la técnica muchos agentes antiangiogénicos y agentes quimioterapéuticos. Una lista ejemplar y no limitante de agentes antiangiogénicos y agentes quimioterapéuticos contemplada se proporciona en el presente documento en las "Definiciones". Véanse también, por ejemplo, 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) y la publicación de patente de Estados Unidos n.º US20030055006.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C de la invención se usa en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para generar efectos aditivos o sinérgicos. En una realización, pueden coadministrarse al paciente dos o más anticuerpos se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes desvelados en el presente documento. En otra realización, los anticuerpos anti-VEGF incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1. En otra realización adicional, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab o ranibizumab. Algunas veces, puede ser beneficioso también administrar una o más citocinas al paciente.

En una realización, se usa un antagonista de VEGF-C en combinación con un agente antiangiogénico tal como un anticuerpo (o fragmento) neutralizante anti-VEGF y/u otros antagonista de VEGF y/o un antagonista de receptor de VEGF, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, el receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)) fragmentos, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpo anti-VEGF-Cs neutralizantes, inhibidores de bajo peso molecular de VEGFR tirosina quinasas (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF, variantes antagonistas de VEGF; y cualquiera de las combinaciones de los mismos. En una realización, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF. En otra realización adicional, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF. En otra realización adicional, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA). En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF es B20-4.1.1 descrito en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2009/0142343. En otra realización adicional, el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti-NRP1 como se describe en la publicación PCT N.º WO2007056470. En otra realización adicional, un agente antiangiogénico es un anticuerpo anti-NRP2 como se describe en la publicación PCT n.º PCT/US2007/069179. En otra realización adicional, el agente antiangiogénico es un anticuerpo descrito en la solicitud PCT n.º PCT/US2007/069185.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse en combinación con inhibidores de tirosina quinasa receptoras de molécula pequeña (RTKI) que se dirigen a uno o más receptores de tirosina y quinasa tales como receptores de VEGF, receptores de FGF, receptores de EGF y receptores de PDGF. Se conocen en la técnica muchas RTKI terapéuticas de molécula pequeña incluyendo sin limitación vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT®), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC®), MLN- 518, CEP-701, PKC- 412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, sorafenib (NEXAVAR®), XL880, y CHIR- 265. Otros agentes terapéuticos útiles para la combinación de la terapia tumoral con el anticuerpo de la invención incluyen antagonistas de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF.

En determinadas realizaciones, pueden coadministrarse dos o más inhibidores de angiogénesis opcionalmente al paciente además del antagonista de VEGF-C y otro agente. En una realización, pueden administrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes contra el cáncer en combinación con un antagonista de VEGF-C, el antagonista de VEGF y un agente antiangiogénico.

En determinados aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral en combinación con un anticuerpo anti-VEGF-C incluyen otras terapias contra el cáncer, por ejemplo tratamientos de cirugía y radiológicos (por ejemplo, irradiación de haces externos o terapia con un agente radiactivo marcado, tal como un anticuerpo). En una realización, el paciente puede recibir un anticuerpo de la invención combinado con radioterapia.

La administración del antagonista de VEGF-C y otro agente terapéutico (agente anti cáncer, agente antiangiogénico) puede realizarse de manera simultánea, por ejemplo, como una sola composición o como 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. Por ejemplo, el agente contra el cáncer puede administrarse primero, seguido por el antagonista de VEGF-C. Como alternativa, o adicionalmente, las etapas pueden realizarse como una combinación tanto secuencialmente como simultáneamente, en cualquier orden. En determinadas realizaciones, los intervalos varían de minutos a días, de semanas a meses, que pueden estar presentes entre las administraciones de dos o más composiciones.

Las cantidades eficaces de agentes terapéuticos que se administran en combinación con un antagonista de VEGF-C serán a criterio del médico o veterinario tratante. La administración de la dosificación y su ajuste se realiza para conseguir un control máximo de las afecciones que vayan a tratarse. Adicionalmente la dosis dependerá de factores tales como el tipo de agente terapéutico que vaya a usarse y el paciente específico que vaya a tratarse. Las dosificaciones adecuadas para el agente contra el cáncer son aquellas actualmente usadas y que pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente anticanceroso y el antagonista de VEGF. 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 común o autorizada. Véase también la sección titulada “Formulaciones y dosificaciones farmacéuticas” del presente documento.

#### *Agentes quimioterapéuticos*

En un aspecto, la invención proporciona 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 VEGF-C y/o uno o más inhibidores de angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos. Pueden usarse diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. En el presente documento se proporciona una lista ejemplar y no limitante de agentes quimioterapéuticos en el apartado de “Definiciones”. La administración del antagonista de VEGF-C y del agente quimioterapéutico puede realizarse simultáneamente, por ejemplo, como una sola composición o como dos o más composiciones distintas, usando la misma o diferentes vías de administración. Como alternativa, o adicionalmente, la administración puede realizarse secuencialmente en cualquier orden. Como alternativa, o adicionalmente, las etapas pueden realizarse como una combinación de secuencial y simultánea, en cualquier orden. En determinadas realizaciones, los intervalos varían de minutos a días, de semanas a meses, que pueden estar presentes entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede administrarse primero, seguido por el antagonista de VEGF-C. Sin embargo, la administración simultánea o la administración del antagonista de VEGF-C primero también se contemplan. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un antagonista de VEGF-C (tal como un anticuerpo anti-VEGF-C), seguido por la administración de un agente quimioterapéutico. En determinadas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días o de semanas a meses entre las administraciones de las dos o más composiciones.

Como entenderán los expertos habituales en la técnica, la dosis apropiada de los agentes quimioterapéuticos será generalmente de aproximadamente aquella ya empleada en las terapias clínicas en las que los agentes quimioterapéuticos se administran en solitario o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. La variación de la dosificación posiblemente 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.

#### *Recidiva del crecimiento tumoral*

La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recidiva del crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de células cancerosas. La recidiva del crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de células cancerosas se usa para describir una afección en la que no es clínicamente adecuado tratar o someter a los pacientes a una o más terapias actualmente disponibles (por ejemplo, terapias contra el cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia/ inmunoterapia biológica, terapia con anticuerpos anti-VEGF-C, particularmente un régimen terapéutico convencional para el cáncer concreto) o los pacientes ya no reciben ningún efecto beneficioso de la terapia de tal manera que estos pacientes necesitan una terapia efectiva adicional. Como se usa en el presente documento, la frase también puede hacer referencia a una afección del paciente “que no responde/resistente al tratamiento”, por ejemplo, que describe pacientes que responden a terapia que ya han padecido efectos secundarios, resistencia al desarrollo, que no responden a la terapia, que no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En diversas realizaciones, un cáncer es recidiva de crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de células cancerosas en las que el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente o ha aumentado o el tamaño del tumor no se ha reducido de manera significativa, o ha aumentado, o no reduce de tamaño más o en cantidades de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son recidiva de crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de células cancerosas puede realizarse *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia de un tratamiento sobre las células cancerosas, usando el significado aceptado en la técnica de “recidiva” o “resistente al tratamiento” o “no respondedor”, en dicho contexto. Un tumor resistente a tratamiento contra VEGF es un ejemplo de una recidiva de crecimiento tumoral.

La invención proporciona métodos para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas en un sujeto administrando uno o más antagonistas de VEGF-C bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de las células cancerosas en el sujeto. En determinadas realizaciones, el antagonista puede administrarse después del agente terapéutico para el cáncer. En determinadas realizaciones, el antagonista de VEGF-C se administra simultáneamente con la terapia del cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, la terapia con el antagonista de VEGF-C se alterna con otra terapia contra el cáncer, que puede realizarse en cualquier orden. La invención también incluye métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para prevenir la aparición o recurrencia del cáncer en pacientes predispuestos a tener

cáncer. Generalmente, el sujeto se sometió o se está sometiendo actualmente a terapia contra el cáncer. En una realización, la terapia contra el cáncer es un tratamiento con un agente antiangiogénesis, por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente antiangiogénesis incluye aquellos conocidos en la técnica y los encontrados en las definiciones del presente documento. En una realización, el agente antiangiogénesis es un 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; WO98/45332; y los documentos 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. Pueden administrarse agentes adicionales en combinación con antagonistas de VEGF y un antagonista de VEGF-C para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de las células cancerosas, por ejemplo, véase la sección titulada "Terapias de combinación" del presente documento.

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

En un aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno asociado con una expresión aumentada de VEGF-C. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-VEGF-C; determinar el nivel de expresión (de manera cuantitativa o cualitativa) de VEGF-C mediante el ensayo de la célula detectando la unión del anticuerpo anti-VEGF-C con VEGF-C; y comparar el nivel de expresión de VEGF-C con la célula de ensayo con el nivel de expresión de VEGF-C con una célula de control (por ejemplo una célula normal del mismo origen tisular que la célula ensayada o una célula que expresa VEGF-C a niveles comparables a los de dichas célula normal) en el que un nivel superior de expresión de VEGF-C en el ensayo en comparación con la célula control indica la presencia de un trastorno asociado con una expresión aumentada de VEGF-C. En determinadas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado con una expresión aumentada de VEGF-C. En determinadas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.

Los trastornos ejemplares que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen, pero sin limitación, la lista de trastornos, tumores y cánceres proporcionada en el presente documento titulada "Definiciones".

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

En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-VEGF-C en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-VEGF-C con VEGF, y determinar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-VEGF-C y VEGF-C. En algunas realizaciones, el complejo es *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa.

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

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-C se marca de manera detectable. El marcador usado es cualquiera funcionalmente detectable que no interfiere con la unión de VEGF-C y el anticuerpo anti-VEGF-C. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o fracciones que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, densos a electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, y <sup>131</sup>I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Se dispone de métodos convencionales para unir estos marcadores por enlace covalente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, agentes acopladores tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidias, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada y similares pueden usarse para etiquetar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferidos del presente documento son enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento estándar manipulativo para un experto habitual en las técnicas de inmunoensayo. Véase, por

ejemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone y Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 1981), págs. 147-166.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos están inmovilizados en una matriz insoluble. La inmovilización entraña la separación de un anticuerpo anti-VEGF-C de cualquier VEGF-C que permanezca libre en solución. Esto se realiza convencionalmente insolubilizando el anticuerpo anti-VEGF-C antes del procedimiento del ensayo, así como por adsorción a una matriz insoluble en agua o una superficie (Bennich *et al.*, U.S. 3.720.760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación de glutaraldehído) o insolubilizando el anticuerpo anti-VEGF-C después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-VEGF-C y VEGF-C, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

15 Los anticuerpos anti-VEGF-C pueden usarse para la detección de VEGF-C en uno cualquiera de los diversos métodos de ensayo de detección conocidos. Por ejemplo, una muestra biológica puede ensayarse con respecto a VEGF-C obteniendo la muestra de una fuente deseada, mezclando la muestra con anticuerpo anti-VEGF-C y permitiendo que el anticuerpo forme el complejo anticuerpo/ VEGF-C con cualquier VEGF-C presente en la mezcla y detectando cualquier complejo de anticuerpo/ VEGF-C presente en la mezcla. La muestra biológica puede prepararse para el ensayo por métodos conocidos en la técnica que son adecuados para una muestra en particular. Los métodos de mezcla de muestras con anticuerpos y los métodos de detección de complejo anticuerpo/ VEGF-C se seleccionan de acuerdo con el tipo de ensayo que vaya a usarse.

20 Los ensayos usados para detectar la unión de anticuerpos anti-VEGF-C con VEGF-C incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígeno que son muy conocidos en la técnica, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ensayos ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), ensayos competitivos y de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, inmunohistoquímica (IHC) y ensayos de inhibición estérica.

25 En una realización, la expresión de VEGF-C en una muestra puede examinarse usando protocolos de inmunohistoquímica y de tinción. Se ha demostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares es un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica utilizan un anticuerpo para sondar y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de muestras, puede usarse una muestra de un tejido o célula de un mamífero (generalmente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, pero sin limitación, células cancerosas tales como de cáncer de colon, de mama, de próstata, de ovario, de pulmón, de estómago, de páncreas, de linfoma y de leucemia. La muestra puede obtenerse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser reciente o congelado. En una realización, la muestra se mezcla y se incluye en parafina o similar. La muestra tisular puede fijarse (es decir conservarse) mediante metodologías convencionales. Un experto habitual en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina en función del propósito para el cual la muestra va a teñirse histológicamente o a analizarse de otra manera. Un experto habitual en la técnica también apreciará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra tisular y del fijador usado.

30 La IHC puede realizarse en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación de fluorescencia *in situ*. Se dispone de dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo con el antígeno diana (por ejemplo, VEGF-C) de determina directamente. Este ensayo directo utiliza un reactivo marcado, tal como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario marcado con una enzima, que puede visualizarse sin interacción posterior con el anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une con el antígeno y después se une un anticuerpo secundario marcado al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar visualización del antígeno. La amplificación de señal se produce porque diversos anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario. El anticuerpo primario y/o secundario que se utiliza para inmunohistoquímica generalmente se marcará con una fracción detectable.

35 Aparte de los procedimientos de preparación de muestras indicados anteriormente, puede desearse el tratamiento adicional de la sección tisular antes de, durante o después de IHC. Por ejemplo, pueden realizarse métodos de recuperación de epítomo, tales como calentamiento de la muestra tisular en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong *et al.* Appl. Immunohistochem. 4 (3): 201 (1996)).

40 Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección tisular se expone al anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de tal manera que el anticuerpo primario se une al antígeno de proteína diana en la muestra tisular. Las condiciones apropiadas para conseguir esto pueden determinarse mediante experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo con la muestra se determina usando cualquiera de uno de los marcadores detectables indicados anteriormente. Preferentemente, el marcador es un marcador enzimático, (por ejemplo HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como cromógeno de 3,3'-diaminobencidina. Preferentemente el marcador enzimático está conjugado con el anticuerpo que se une

específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anticonejo).

5 Los especímenes preparados de esta manera pueden montarse y cubrirse con un cubreobjetos. La evaluación del portaobjetos se determina después por ejemplo usando un microscopio y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, habitualmente utilizados en la técnica. Los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse de la siguiente manera:

TABLA 2

Patrón de tinción	Puntuación
No se observa tinción en las células.	0
Tinción débil/escasamente perceptible se detecta en más del 10 % de las células.	1+
Se observa tinción débil a moderada en más del 10 % de las células.	2+
Se observa tinción de moderada a fuerte en más del 10 % de las células.	3+

10 Generalmente, una puntuación de patrón de tinción de aproximadamente 2+ o superior en un ensayo IHC es diagnóstica y/o pronóstica. En algunas realizaciones, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 1 + o superior es diagnóstica y/o pronóstica. En otras realizaciones, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 3 o superior es diagnóstica y/o pronóstica. Se entiende que cuando las células y/o tejidos de un tumor o adenoma de colon se examinan usando IHC, la tinción se determina generalmente o se evalúa en una célula y/o tejido tumoral (a diferencia de tejido estromal o circundante que pueda estar presente en la muestra).

15 Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o de tipo sándwich están bien establecidos y se usan ampliamente en la industria de diagnóstico comercial. En una realización, para explorar anticuerpos que se unen a un epítipo particular en el antígeno de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el que se describen en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un mapeo epitópico, por ejemplo como se describe en Champe *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés. También se proporcionan métodos ejemplares detallados para el mapeo de un epítipo al cual se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno de ellos bloquea la unión del otro al 50 % o más.

20 Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de VEGF-C rastreador para competir con el VEGF-C de la muestra de ensayo por un número limitado de sitios de unión a antígeno del anticuerpo anti-VEGF-C. El anticuerpo anti-VEGF-C generalmente está insolubilizado antes o después de la competición y después el rastreador y el VEGF-C unidos al anticuerpo anti-VEGF-C se separan del rastreador no unido y VEGF-C. Esta separación se realiza decantando (cuando el compañero de unión se preinsolubilizó) o centrifugando (cuando el compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de muestra de ensayo de VEGF-C es inversamente proporcional a la cantidad de rastreador unido medido por la cantidad de sustancia marcadora. Las curvas de respuesta a la dosis con cantidades conocidas de VEGF-C se preparan y comparan con los resultados de ensayo para determinar cuantitativamente la cantidad de VEGF-C presente en la muestra de ensayo. Estos análisis se denominan sistemas ELISA cuando las enzimas se usan como marcadores detectables.

25 Otra especie de ensayo competitivo, denominado ensayo "homogéneo", no requiere una separación de fases. En este caso, un conjugado de una enzima con el VEGF-C se prepara y usa de tal manera que cuando el anticuerpo anti-VEGF-C se une al VEGF-C en presencia del anticuerpo anti-VEGF-C modifica la actividad enzimática. En este caso, el VEGF-C o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional con una enzima tal como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para su uso con anticuerpos anti-VEGF-C de tal manera que la unión del anticuerpo anti-VEGF-C inhibe o potencia la actividad enzimática del marcador. De por sí este método se practica ampliamente con el nombre de EMIT.

30 Los conjugados estéricos se usan en métodos de impedimento estérico para ensayos homogéneos. Estos conjugados se sintetizan mediante unión covalente de un hapteno de bajo peso molecular con un fragmento de VEGF-C pequeño de tal manera que el anticuerpo con el hapteno no puede unirse sustancialmente al conjugado y al mismo tiempo como un anticuerpo anti-VEGF-C. Bajo este procedimiento de ensayo, el VEGF-C presente en la muestra de ensayo se unirá al anticuerpo anti-VEGF-C, permitiendo de este modo que al antihapteno se una al conjugado, dando como resultado un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio de fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

35 Los ensayos de tipo sándwich son particularmente útiles para la determinación de VEGF-C o anticuerpos anti-VEGF-C. En los ensayos sándwich secuenciales se usa un anticuerpo anti-VEGF-C inmovilizado para adsorber VEGF-C de la muestra de ensayo, la muestra de ensayo se retira mediante lavado, el VEGF-C unido se usa para adsorber un segundo anticuerpo anti-VEGF-C marcado y el material unido se separa también del rastreador residual. La cantidad de rastreador unido es directamente proporcional al VEGF-C en la muestra de ensayo. En ensayos sándwich

“simultáneos” la muestra de ensayo no se separa antes de añadir el anti-VEGF-C marcado. Es útil un ensayo en sándwich secuencial que usa un anticuerpo monoclonal anti-VEGF-C como primer anticuerpo y un anticuerpo policlonal anti-VEGF-C como el otro para ensayar muestras respecto de VEGF-C.

5 Lo anterior son exclusivamente ensayos de detección ilustrativos de VEGF-C. Se incluyen dentro del alcance del presente documento otros métodos actuales o desarrollados posteriormente que usen anticuerpo anti-VEGF-C para la determinación de VEGF-C.

10 Se entiende que cualquiera de las realizaciones anteriores de diagnóstico o detección puede realizarse usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-VEGF-C.

#### Artículos de fabricación

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y un marcador o un prospecto sobre o asociado con en el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden formarse de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El envase mantiene una composición que está en sí misma o combinada con otra composición eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la afección y puede tener un puerto de entrada estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica. Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o un inmunoconjugado de la invención. El marcador o inserto indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición en su interior, en el que la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y

20 (b) un segundo envase con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un agente citotóxico o cualquier otro agente terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa, o de manera adicional, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, *bacteriostatic water for injection*), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

35 Aunque la descripción anterior de la invención se ilustra con referencia a determinadas realizaciones, esta no está limitada. De hecho, pueden realizarse diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento que serán obvias para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y que se encuentran dentro del ámbito de las reivindicaciones que se adjuntan. A lo largo de la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones, el término “comprende” se usa como una frase inclusiva, de transición abierta-cerrada, que no excluye los elementos adicionales no descritos o las etapas de los métodos.

40

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

##### 45 Generación y caracterización de los anticuerpos anti VEGF-C

Las bibliotecas de anticuerpos de fagos sintético se construyeron en una sola región marco conservada (anticuerpo anti-ErbB2 humanizado, 4D5) introduciendo diversidad dentro de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera (Lee, C. V. *et al.* J Mol Biol 340, 1073-93 (2004)). En resumen, las bibliotecas de anticuerpos sintéticos de presentación de fagos se construyeron en una sola región marco conservada introduciendo diversidad sintética en posiciones expuestas a disolvente dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada. Para mejorar el rendimiento de la biblioteca, las bibliotecas del fragmento de unión a antígeno (Fab) monovalente y bivalente se construyeron y se exploraron diferentes diversidades de CDR-H3 modificando la composición de aminoácidos y la longitud de la CDR. Después la biblioteca se expandió aumentando la variabilidad de la longitud de CDR-H3 y usando codones diseñados que imitaban a la composición de aminoácidos de las secuencias CDR-H3 naturales. Usando estas bibliotecas con las CDR sintéticas completamente presentadas sobre un solo armazón con anticuerpos de alta afinidad se generaron. Para detalles adicionales de estrategias y métodos para la generación de bibliotecas de anticuerpos sintéticos con moldes sencillos, véase, por ejemplo, el documento WO 2005/012359 publicado el 10 de febrero de 2005.

60

La selección de placas con bibliotecas vírgenes se realizó frente a la forma madura del VEGF-C humano (R&D systems) 5 µg/ml inmovilizados en inmunoplaquetas MaxiSorp™. Después de ocho rondas de enriquecimiento, los clones se seleccionaron al azar y se identificaron aglutinantes específicos usando ELISA para fagos. Para cada clon de fago positivo, se subclonaron regiones variables de cadenas pesada y ligera en vectores de expresión pRK que se diseñaron para expresar las cadenas de IgG de longitud completa. Las construcciones de cadena pesada y cadena ligera se cotransfectaron en células 293 o CHO, y los anticuerpos expresados se purificaron del medio

65

asérico usando la columna de afinidad con proteína A. los anticuerpos purificados se ensayaron por ELISA bloqueando la interacción entre VEGF-C humano y VEGFR3 humano. Para la maduración de afinidad, las fagotecas con diferente combinación de bucles CDR (CDR-L3 y H3) procedentes del clon inicial de interés se construyeron mediante una estrategia de aleatorización suave de tal manera que cada posición seleccionada se mutó en un resto de tipo no silvestre o se mantuvo como tipo silvestre a una frecuencia de aproximadamente 50:50 (Lee, C. V *et al.*, Blood, 108: 3103-3111, 2006). Después, los clones de alta afinidad se identificaron a través de cuatro rondas de selección en fase de solución contra VEGF-C humano biotinilado y después se capturaron mediante neutravidina cubierta sobre placas de Maxisorp de 96 pocillos (5 µg/ml). La concentración de antígeno marcado con biotina disminuyó, lo que permitía una mayor rigurosidad en la selección.

### Ejemplo 2

#### Afinidades de unión, mapeo epitópico y análisis de bloqueo de los anticuerpos anti VEGF-C

Los clones de fago se propagaron desde una sola colonia cultivando en 30 ml de cultivo 2YT complementado con carbenicilina y fago auxiliar KO7 durante una noche a 30 °C, y se purificó como se describe (Lee, CV, J Mol Biol 340, 2004). El fago se tituló primero diluyendo en PBS con BSA al 0,5 % y Tween 20 al 0,05 % (PBT) y se ensayó la unión a una placa cubierta con hVEGF-C. La dilución que dio una saturación del 50 %-70 % se usó para realizar el ensayo de unión competitiva en el que el fago se incubó primero con concentraciones en aumento de hVEGF-C durante 1-2 horas y después se transfirió a placas recubiertas con hVEGF-C para capturar el fago no unido. La cantidad de fago unido se midió con un conjugado de peroxidasa de rábano picante anticuerpo anti-M13 (Amersham) y se reveló con tetrametilbencidina (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como sustrato durante ~5 minutos, se desactivó con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M y se leyó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon como la concentración de antígeno soluble que inhibía el 50 % del fago de la unión frente al antígeno inmovilizado. Véanse además las figuras 33, 35 y 36.

Para determinar las afinidades de unión de las IgG anti-VEGF-C, se utilizó medición de resonancia de plasmón superficial (SRP) con un instrumento BIAcore™-3000. En primer lugar, las IgGs humanas anti- VEGF-C se capturaron en microplacas biodetectoras CM5 para conseguir aproximadamente 500 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie con factor dos de VEGF-C humano (de 12,5 nM a 500 nM) por separado en tampón PBT (PBS con Tween 20 al 0,05 % (v/v)) a 25 °C con un caudal de 30 µl/min. Se calcularon las constantes de asociación ( $k_{on}$ ) y disociación ( $k_{off}$ ) usando un modelo de unión de simple de uno a uno de Langmuir (programa informático BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calculó como la proporción de  $k_{off}/k_{on}$ . Véanse también las figuras 31 y 34.

Para evaluar las actividades de bloqueo del receptor de la IgG anti-VEGF-C, se incubaron primero diluciones en serie de factor tres de IgG anti-VEGF-C con una concentración de VEGF-C marcado con biotina optimizada en tampón PBST durante 2 horas, seguido de captura sobre una placa Maxisorp cubierta con VEGFR3 durante 15 minutos. La cantidad de unión de VEGF-C marcado con biotina a VEGFR3 se detectó con conjugados de estreptavidina-HRP. Véanse también las figuras 10 y 32.

Para mapear el epitopo de los anticuerpos anti-VEGF-C, primero se incubaron diluciones en serie con factor tres de IgG VC4.5 con una placa Maxisorp de 96 pocillos cubierta con hVEGF-C C137S (5 µg/ml) en tampón PBST durante 2 horas, seguido por la adición de fago anti-VEGF-C con una concentración de una señal de DO 450 nm optimizada durante 15 minutos. La cantidad de fago anti-VEGF-C unido a hVEGF-C C137S se detectó con conjugados anti-M13 con HRP. Véase también la figura 37.

### Ejemplo 3

#### Cultivos de células

Las células endoteliales micro vasculares linfáticas dérmicas humanas (LEC) HMVEC-dLyAd y las HUVECS se adquirieron en Cambrex se cultivaron en medio EGM-2 (Cambrex). Las células LacZ C6 se adquirieron en la ATCC. Las células tumorales se cultivaron en DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10 %. Todas las células se mantuvieron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %, y en una incubadora con una humedad del 95 %.

#### Ensayo de migración celular

Se observó que VEGF-C inducía posiblemente la liberación y proliferación de células endoteliales de origen linfático (LEC) y venoso (HUVEC) probablemente, uniéndose y activando a VEGFR2 y VEGFR3.

Los ensayos de migración se realizaron utilizando una cámara Boyden modificada con un tamaño de poro de 8 µm Falcon en un sistema de inserto de 24 multipocillos (BD Biosciences). Las placas se recubrieron con fibronectina 5 µg/ml (Invitrogen) durante 2 horas a 37 °C. Se añadieron las células en 100 µl de medio de ensayo (BSA al 0,1 %, EGM-2) sin/con anticuerpos a la cámara superior. Se añadió quimio atrayente en la cámara inferior en 500 µl de medio de ensayo y las células se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Las células en la membrana superior se retiraron con una torunda de esponja y las células de la superficie inferior se fijaron en etanol al 70 % y se tiñeron

con verde Sytox green (Molecular Probes). Se tomaron imágenes de toda la cámara superior del pocillo, y se contó el número de células que habían migrado (6 pocillos por condición). Véanse también las figuras 7 y 40. El anticuerpo anti-VEGF-C bloqueó fuertemente tanto la migración inducida por VEGF-C maduro como VEGF-C FL. El anticuerpo anti VEGF-C no tuvo ningún efecto sobre la migración inducida por VEGF o HGF de las HUVEC, lo que confirma su especificidad.

#### Ensayos de proliferación celular

Se cubrió una placa de fondo transparente oscuro de 96 pocillos (VWR) con fibronectina 5 µg/ml (Invitrogen) a 37 °C durante 2 horas. Las LEC se recogieron y se resuspendieron en medio de ensayo (BSA al 0,1 %, EGM-2) a 3000 células/100 µl y se añadieron a los pocillos. Las células se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Se añadió solución marcada con BrdU (kit de ELISA de proliferación celular; Roche) y las células se incubaron durante 24 horas más a 37 °C. La incorporación de BrdU se determinó mediante ensayo de quimioluminiscencia (6 pocillos por condición). Véanse también las figuras 8, 12 y 45. El anticuerpo anti-VEGF-C bloqueó fuertemente la proliferación inducida por VEGF-C de longitud completa y VEGF-C maduro. El anticuerpo anti VEGF-C no tuvo ningún efecto sobre la proliferación inducida por VEGF o HGF de las HUVEC, lo que confirma su especificidad.

#### Ensayos de germinación

Se incubaron perlas microtransportadoras Cytodex 3 cubiertas con dextrano (Amersham) con LEC (400 células por perla) en EGM-2, que contenía VEGF-C 200 ng/ml, durante 4 horas a 37 °C invirtiendo cada 20 minutos. Después las perlas se sembraron durante en placas durante una noche a 37 °C para separar las células no cubiertas en las perlas. Para inducir la coagulación, las perlas recubiertas con 0,5 ml de células en EGM-2 con fibrinógeno 2,5 mg/ml (200 perlas/ml) +/- VEGF-C y anticuerpos se añadieron en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos que contenía 0,625 unidades de trombina y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y después durante 20 minutos a 37 °C. El coágulo se equilibró en EGM-2 durante 30 minutos a 37 °C. Después, el medio de reemplazó con EGM-2 que contenía células de fibroblastos de piel (Detroit 551, 20.000 células/ml). Se añadieron anticuerpos +/- VEGF-C a cada pocillo y es ensayo se monitorizó durante 14 días cambiando el medio cada 2-3 días. Se tomaron 10 imágenes de las perlas por condición con un microscopio invertido. Véase también la figura 9.

#### Ensayo de micro bolsillo de correa de ratón

Se anestesió a ratones CD-1 adultos (Charles-River) y se creó un bolsillo de 2 x 3 mm a 1 mm desde el centro de la córnea en el epitelio por micro disección como se ha descrito anteriormente (Polverini *et al.*, Methods Enzymol 198: 440-450 (1991)). Los agentes a ensayar con respecto a la actividad linfangiogénica se inmovilizaron en un sedimento hidrón inerte (2 x 2 mm). El sedimento se implantó después en la base del bolsillo. Los animales se trataron con anticuerpo control (10 mg/kg) o anti-VEGF-C (10 mg/kg) i.p. dos veces a la semana durante 2 semanas. Después, los animales se perfundieron con isolectina B4 marcada con FITC (Sigma) para identificar los vasos sanguíneos y después se perfusionó con PFA al 4 % mediante una punción cardíaca ventricular izquierda, se sacrificaron y se diseccionaron las córneas. Los ganglios linfáticos se visualizaron en un IHC montado por completo con anticuerpo anti-LYVE-1 (R&D Systems 1: 500). Las córneas se fotografiaron y los vasos sanguíneos (marcados con FITC) y los vasos linfáticos positivos a LYVE-1 surgidos del limbus se cuantificaron. Véanse también las figuras 13 y 14. En este modelo la angiogénesis y linfangiogénesis están completamente bloqueadas mediante la administración sistémica del anticuerpo anti-VEGF-C, pero no están afectadas por el anticuerpo anti-VEGF.

#### Ensayos de señalización del receptor VEGF

Se estimularon células HUVEC confluentes durante 10 minutos con 200 ng/ml de VEGF-C en presencia o en ausencia de anticuerpos de control o anti-VEGF-C. Las células se lisaron y ensayaron con respecto a muchos mediadores conocidos que desempeñan una función en la señalización del receptor de VEGF. La activación de VEGFR2 se evaluó usando ensayos ELISA de VEGFR2 y de fosfo-VEGFR2 (kit ELISA DuoSet IC, R&D). Véase también la figura 11. La activación de VEGFR3 se evaluó usando un ensayo de activación del receptor de quinasa (KIRA) con una línea celular VEGFR3-293 como se ha descrito anteriormente (Sadick *et al.*, 1999). Véase también la figura 41. En resumen, se ensayaron líneas celulares 293 estables que expresan hVEGFR3 humano marcado con Flag de longitud completa con respecto a la fosforilación del receptor después de la estimulación. Se recogieron 5 x 10<sup>4</sup> células durante una noche (DMEM con BSA al 1 %) y después se estimularon con VEGF A 40 ng/ml (Genentech South San Francisco, CA) o VEGF-C 200 ng/ml (Genentech Inc., South San Francisco, CA) durante 8 minutos. Las células se lisaron en PBS que contenía tritón al 1 % y ortovanadato sódico. Las placas ELISA se recubrieron con el anticuerpo Flag de captura (Sigma St Louis, MO). Las placas se cubrieron (PBS + 1 µg/ml de anticuerpo) durante una noche y se bloquearon (PBS + BSA al 0,5 %) durante 1 hora. Después de 3 lavados (PBS + Tween 20 al 0,05 %), los lisados se añadieron durante 2 horas, se lavaron tres veces, seguido por la adición del anticuerpo fosfodetección 4G10 (Upstate Lake Placed, NY) durante 2 horas. La detección se realizó con el anticuerpo HRP (Amersham Piscataway, NJ) y sustrato TMB. Las placas se leyeron a 450 nm. El anti-VEGF-C inhibió completamente la fosforilación mediada por VEGF-C de VEGFR2 y VEGFR3.

Ensayo de permeabilidad de vasos de piel de ratón

Los dorsos y costados de ratones hembra C57BL6J se rasuraron y dividieron en 4 áreas de tratamiento. Después recibieron una inyección i.v. de solución de azul de Evan al 0,5 % 150 µl. Una hora después la inyección de azul de Evan, se se inyectaron 20 µl de PBS que contenía BSA o VEGF-C (7,5 µg/ml) con o sin anticuerpo anti-VEGF-C o VEGFR3 ECD (0,5 mg/ml) por vía intradérmica, al azar en una de las cuatro zonas. Una hora más tarde, los animales se sacrificaron y la piel se diseccionó y se tomaron imágenes. Las muestras de piel de cada zona de inyección se cortaron y se incubaron en solución con formamida a 55 °C durante 48 horas para extraer el colorante azul. La absorbancia de la solución se midió después con un espectrofotómetro a 600 nm. La cuantificación de la tinción azul de Evan extraída de las muestras de piel en el ensayo de permeabilidad se muestra en la figura 42. El tratamiento con anticuerpo anti-VEGF-C y VEGFR3 ECD redujo la permeabilidad vascular inducida por VEGF-C. La permeabilidad vascular inducida por VEGF no se bloqueó con anti-VEGF-C, lo que confirma la especificidad.

Estudios con animales

Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio, publicada por los NIH (publicación NIH 85-23, revisada en 1985). Un comité de uso y cuidado de animal institucional (IACUC) autorizó todos los protocolos con los animales.

Modelos de tumor

Previamente se ha descrito que VEGF-C desempeña un papel en el crecimiento tumoral primario y la diseminación de células tumorales induciendo la angiogénesis y la linfangiogénesis (Alitalo y Carmeliet, *Cáncer Cell* 1, 219-227 (2002); Cao *et al.*, *PNAS* 95, 14389-14394 (1998); Skobe *et al.*, *Nature Medicine* 7, 192-198 (2001 b); Su *et al.*, *Cáncer Cell* 9, 209-223 (2006)). Dado que el anticuerpo anti-VEGF-C descrito en el presente documento bloquea la angiogénesis y la linfangiogénesis en el ensayo de micro bolsillo de córnea, se evaluó su capacidad para modular el crecimiento tumoral primario en modelos de tumor 66c 14, y H460 donde se había observado que anti-VEGF tenía una actividad antiangiogénica incompleta.

Para 66C14, las células se recogieron mediante tripsinización, se lavaron y resuspendieron en PBS a una concentración de  $2 \times 10^5$  células en 10 µl de PBS. Los ratones se anestesiaron usando ketamina 75 mg/kg y xilacina 7,5 mg/kg, y se realizó una incisión por debajo de la pata delantera derecha. Se inyectaron  $2 \times 10^5$  células en 10 µl de PBS directamente en el 4º panículo adiposo mamario de ratones balb-C hembra de 6-8 semanas de vida. Para C6, se inyectaron  $2 \times 10^6$  células tumorales en PBS 100 µl PBS por vía subcutánea en el costado derecho de ratones desnudos balb-C hembra de 6-8 semanas de vida. En ambos conjuntos de estudios, el crecimiento tumoral se monitorizó tres veces a la semana. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 80-120 mm<sup>3</sup>, los ratones se clasificaron para dar tamaños de tumor medio de grupos casi idénticos, y comenzó el tratamiento. Esto se consideró como día 1 de cada estudio. Los animales se trataron con anticuerpo control (10 mg/kg) o anti-VEGF-C (10 mg/kg) i.p. dos veces a la semana hasta finalizar el estudio. Todos los estudios se repitieron tres veces para garantizar la reproducibilidad. Véanse además las figuras 15-16, 19-20 y 44.

Se realizaron estudios de modelo tumoral H460 y A549 en el centro Piedmont Research Center, LLC (Morrisville, NC) usando técnicas estandarizadas. En resumen, los xenoinjertos se iniciaron a partir de células de carcinoma de pulmón no microcítico humano cultivado H460 (cultivado a una fase semilogarítmica en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal termoinactivado al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina G, sulfato de estreptomina 100 µg/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml, piruvato sódico 1 mM, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, bicarbonato sódico 0,075 %, y gentamicina 25 µg/ml) o de células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 (cultivadas en medio F12 de Ham modificado por Kaighn que contenía suero bovino fetal termo inactivado al 10 %, penicilina G 100 unidades/ml, sulfato de estreptomina 100 µg/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml, glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, y gentamicina 25 µg/ml). El día del implante tumoral, las células H460 se recogieron y se resuspendieron en PBS a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml. Cada ratón de ensayo recibió  $1 \times 10^7$  células tumorales H460 implantadas por vía subcutánea en el costado derecho. Para los tumores A549, las células A549 se resuspendieron en matriz Matrigel™ al 100 % (BD Biosciences) a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml. Se implantaron células A549 ( $1 \times 10^7$  en 0,2 ml) por vía subcutánea en el costado derecho de cada ratón de ensayo, y se monitorizó el crecimiento del tumor. Los animales se clasificaron en función del tamaño del tumor en cuatro grupos (n = 10) con volúmenes tumorales medios por grupo de 111-112 mm<sup>3</sup> y los tamaños de tumor individual variaban de 75 a 196 mm<sup>3</sup> y esto se consideró el día 1 del estudio. Se calculó el volumen tumoral usando la fórmula: Volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) = ((w<sup>2</sup>\*l)/2) en la que w = anchura y l = longitud en mm de un tumor H460.

Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante cinco semanas (i.p. 2x /sem x 5), con anticuerpo anti-VEGF B20-4.1 dosificado a 5 mg/kg, y anticuerpo anti-VEGF-C dosificado a 10 mg/kg. Los ratones del grupo 1 recibieron PBS y sirvieron como un grupo de control de crecimiento tumoral. Los grupos 2 y 3 recibieron monoterapia con anti-VEGF B20-4.1 y anticuerpos anti-VEGF-C, respectivamente. El grupo 4 recibió anticuerpo anti-VEGF B20-4.1 administrado en combinación con el anticuerpo anti-VEGF-C. Para la combinación del grupo de tratamiento, el anticuerpo anti-VEGF-C se administró no más de treinta minutos después

de dosificar el anticuerpo anti-VEGF B20-4.1. Cada dosis se suministró en un volumen de 0,2 ml por 20 gramos de peso corporal (10 ml/kg), y se graduó con respecto al peso corporal del animal.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera: porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral (%TGI) = (volumen medio tumoral del grupo control – volumen medio tumoral del grupo de tratamiento / volumen medio tumoral del grupo control) x 100. El % TGI se mide solo siempre que todos los animales permanezcan en el estudio. El tiempo hasta el punto final (TTE) =  $\log_{10}$  (volumen de punto final  $\text{mm}^3$ ) - b / m; en el que b es el intercepto y m es la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal de los datos de crecimiento de tumor transformados logarítmicamente. La disminución del porcentaje del crecimiento tumoral (%TGD) = (TTE media de grupo de tratamiento - TTE media del grupo control / TTE del grupo control) x 100. Véanse también las figuras 17 y 18.

Al final del estudio los animales se anestesiaron y perfundieron con PFA al 4 %. Los tumores se recogieron, se crioprotegieron y se congelaron en OCT (Tissue-Tek). Los pulmones se inflaron mediante una perfusión ventricular derecha de 10 ml de PBS seguido por PFA al 4 %, y se realizaron recuentos visuales de lesiones metastásicas antes de análisis Micro-CT.

En el modelo 66c14, el anticuerpo anti-VEGF-C redujo significativamente el crecimiento tumoral primario. Véanse las figuras 16 y 44. Esa respuesta se tradujo en un beneficio de supervivencia aumentado con el tratamiento anti-VEGF-C. Adicionalmente, el anticuerpo anti-VEGF-C también mostró eficacia en el modelo H460.

La capacidad de ambos anticuerpos anti-VEGF y anti-VEGF-C para inhibir el crecimiento tumoral cuando se utilizan como agentes únicos sugiere que tanto VEGF como VEGF-C desempeñan importantes funciones en la promoción de la angiogénesis. En el modelo 66c14, el tratamiento de combinación del anticuerpo anti-VEGF-C con el anticuerpo anti-VEGF mostró una reducción casi completa en el crecimiento tumoral primario en comparación con solo el agente. Véase la figura 16. Esto también dio como resultado un beneficio de supervivencia aumentada. Este efecto también se observó en el modelo del tumor H460 en el que el tratamiento de combinación era más efectivo inhibiendo el crecimiento de tumor primario que en cualquier tratamiento en solitario. Véase la figura 17. La inhibición del crecimiento de tumor primario se redujo significativamente en el grupo de combinación con respecto al grupo de tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF.

Además, estos datos sugieren que la inhibición simultánea de VEGF-C y VEGF proporciona un beneficio adicional para la estasia del crecimiento tumoral primario. Véase la figura 43.

El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C dio como resultado una reducción del crecimiento tumoral medio y un aumento en la supervivencia en tumores A549 en combinación con el anticuerpo anti-VEGF-A. Sin embargo, el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF-C no dio como resultado una reducción del crecimiento tumoral como un solo agente en este modelo. Se llegó al razonamiento de que esto se debe a los altos niveles de proteína VEGF encontrados en este modelo, que podrían enmascarar el efecto del bloqueo de VEGF-C. Además, se llega a la hipótesis de que VEGF-C podría volverse biológicamente significativo en el entorno de inhibición VEGF, cuando los niveles de VEGF-C, pueden, hasta cierto grado, compensar funcionalmente el VEGF bloqueado. Para ensayar esto se evaluó el tratamiento de combinación de modelo A549 y se encontró que este tratamiento daba como resultado una disminución significativa en el crecimiento tumoral primario en el grupo de combinación sobre el grupo de tratamiento con anticuerpo anti-VEGF (TGI de 62 % en comparación con anti-VEGF;  $p=0,007$ ). Esta mejora también se observó en la supervivencia, como se muestra mediante la representación gráfica Kaplan-Meier con aumento TGD del 65 % en el grupo tratado con anti-VEGF al 263 % en el grupo tratado con la combinación. Imágenes representativas de secciones teñidas con HyE en tumores A549 tratados con combinación de anti-VEGF-A y anti-VEGF-C mostraron también que el tratamiento de combinación con el anticuerpo anti-VEGF-C y el anticuerpo anti-VEGF-A daba como resultado cambios histológicos drásticos en la masa tumoral primaria.

#### Análisis micro CT de pulmones

Los pulmones se sumergieron en NBF al 10 % durante 24 horas, después se sumergieron en una solución al 20 % de un agente de contraste de tomografía computarizada de rayo x basado en yodo, Isovue370 (Bracco Diagnostics Inc, Princeton, NJ), durante 24 horas. Después, los pulmones se sumergieron y se perfundieron mediante una cánula en la tráquea con 20 ml de aceite de semilla de soja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una velocidad de 0,25 ml/min. El aceite de semilla de soja se utilizó para extraer el exceso de agente de contraste y proporcionar una media de fondo para la formación de imágenes.

Se tomaron imágenes de los pulmones de los ratones *ex vivo* con una tomografía microcomputarizada de rayos X VivaCT (SCANCO Medical, Basserdorf, Suiza) sistema micro CT. Se obtuvo una imagen de corte sagital, comparable con una de rayos X plano convencional para definir el punto de inicio y final para la adquisición axial de una serie de portaobjetos de imágenes micro CT. La localización y número de imágenes axiales se seleccionó para proporcionar una cobertura completa del pulmón. Los pulmones se sumergieron en aceite de semilla de soja como medio de fondo. Las imágenes micro CT se generaron haciendo funcionar el tubo de rayos X a un nivel de energía de 45 kV, una corriente de 160  $\mu\text{A}$  y un tiempo de integración de 450 milisegundos. Se obtuvieron imágenes axiales a una resolución isotrópica de 21  $\mu\text{m}$ . Se obtuvieron cálculos estimados del tumor pulmonar (número y volumen)

mediante un algoritmo de análisis de imágenes semi automatizado que incluye una etapa de inspección por parte de un lector entrenado. Los tumores pulmonares aparecieron como una masa sólida hiper intensa con respecto a estructuras porosas similares a una malla del pulmón normal. Esto se debe a la absorción del agente de contraste de yodo por las estructuras sólidas (paredes bronquiales y de los alveolos, tumores, tráquea, mediastino) contenidas en el pulmón. El agente de contraste en exceso se retiró de los espacios cargados con aire mediante la etapa de perfusión de aceite. Se extrajeron las posibles masas tumorales mediante una serie de etapas de procesamiento de imágenes. El programa informático de análisis de imágenes se desarrolló en el laboratorio. Se escribió en C++ y se emplearon bibliotecas que actúan con el programa informático de análisis de imágenes Analyze (AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS, USA). El algoritmo emplea un umbral de intensidad, un filtro morfológico y una región de crecimiento para extraer todas las posibles masas tumorales. Se determinó un umbral de intensidad (1.480 unidades Hounsfield) mediante análisis con histograma de 5 pulmones arbitrarios empleados para el desarrollo del algoritmo y se seleccionó un umbral óptimo para incluir vóxeles de tumor y excluir cualquier señal de fondo. Las operaciones morfológicas (erosión, dilatación) y crecimiento de la región se aplicaron a regiones hiper intensas conectadas de vóxeles y se retiraron todos los vóxeles de similar densidad encontrados en las paredes finas de los bronquiolos y alveolos. La etapa de crecimiento de la región requiere un volumen mínimo de 2.300 vóxeles conectados (más de 0,0231 mm<sup>3</sup>) para aceptar como un objeto (masa). Los objetos identificados se valoran después mediante un lector entrenado con el programa informático de visualización 3D Analyze. Los objetos individuales se aceptaron o rechazaron como posibles tumores en función de la aparición del objeto y su localización dentro del pulmón. Los objetos se rechazaban si residían fuera del pulmón (por ejemplo, mediastino, restos de tejido extraño) o aparecían en un vaso lleno con sangre. El recuento tumoral, el volumen tumoral individual y el volumen tumoral total se determinaron en cada pulmón. Véanse también las figuras 20, 21 y 46.

#### Inmunohistoquímica

Se cortaron y montaron criosecciones de tejido 18 µm en portaobjetos de vidrio. Las secciones se incubaron durante una noche con anticuerpo primario (anti-LYVE-1 (anti-R&D, 1:200), anti-PECAM-1 (Benton Dickinson, 1:500), MECA32 (Abcam, 1:1000), o Ki67 (Neovision 1:100) a 4 °C. Después las muestras se tiñeron con anticuerpos secundarios Alexa 488 o Alexa 568 (1:200; Molecular Probes) durante 4 horas a TA. La tinción con el anticuerpo secundario solamente se utilizó como control. Se realizó tinción TUNNEL con un kit comercial (Roche). Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia Axiophot de Zeiss. El área de los vasos sanguíneos y linfáticos se determinó a partir de 6 imágenes representativas para cada uno de los 6-10 tumores por grupo, se evaluó el número medio de píxeles mediante el programa informático ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, visitado por última vez el 12 de julio de 2007) como se ha descrito anteriormente (Mancuso *et al.*, J Clin Invest (2006); 116 (10): 2585-7. Véase también la figura 21.

35 Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC. Bagri, Anil D. Fuh, Germaine Lee, Chingwei V.

40 <120> ANTICUERPOS ANTI-VEGF-C Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> P4391R1 WO

45 <141> 15-09-2010

<150> US 61/285.910

<151> 11-12-2009

<150> US 61/284.753

50 <151> 23-12-2009

<160> 91

<210> 1

<211> 10

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

60 <400> 1

**Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Asp Ile His**

**5**

**10**

<210> 2

<211> 10







ES 2 565 208 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 5  
 <400> 18  
                   **Ser Arg Leu Phe Asp Val Ile Phe Asp Tyr**  
   5  10  
 <210> 19  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 15 <400> 19  
                   **Val Arg Leu Phe Gly Ile Ile Phe Asp Tyr**  
   5  10  
 <210> 20  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 25 <400> 20  
                   **Val Arg Leu Tyr Asp Val Ile Phe Asp Tyr**  
   5  10  
 <210> 21  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 35 <400> 21  
                   **Ala Arg Leu Phe Asp Val Ile Phe Asp Tyr**  
   5  10  
 <210> 22  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 45 <400> 22  
                   **Ala Arg Trp Arg Asp Tyr Arg Phe Gly Gly Val Met Asp Tyr**  
   5  10  
 <210> 23  
 <211> 15  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 55 <400> 23

ES 2 565 208 T3

**Ala Arg Asp Ala Asp Tyr Asp Tyr Ala Gly Trp Ala Phe Asp Tyr**  
**1 5 10 15**

5 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10 <400> 24

**Ala Arg Asp Ala Asp Tyr Ala Tyr Ala Trp Trp Ala Phe Asp Tyr**  
**1 5 10 15**

15 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20 <400> 25

**Ala Arg Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Ala Trp Trp Ala Leu Asp Tyr**  
**1 5 10 15**

25 <210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

30 <400> 26

**Ala Arg Asp Ala Asp Tyr Lys Tyr Ala Phe Trp Ala Phe Asp Tyr**  
**1 5 10 15**

35 <210> 27  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

40 <400> 27

**Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala**  
**5 10**

45 <210> 28  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

50 <400> 28

**Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser**  
**5**

55 <210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



ES 2 565 208 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> secuencia sintetizada

<400> 35

**Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Pro Thr**  
**5**

10 <210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> secuencia sintetizada

<400> 36

**Gln Gln Ser Tyr Ile Thr Pro Pro Thr**  
**5**

20 <210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> secuencia sintetizada

<400> 37

**Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Pro Thr**  
**5**

30 <210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> secuencia sintetizada

<400> 38

**Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Leu Thr**  
**5**

40 <210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> secuencia sintetizada

<400> 39

**Gln Gln Thr Tyr Arg Ile Pro Tyr Thr**  
**5**

50 <210> 40  
<211> 87  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> secuencia sintetizada

<400> 40

ES 2 565 208 T3

```

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

```

5 <210> 41  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10 <400> 41

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1          5          10          15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
          20          25          30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
          35          40          45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
          50          55          60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
          65          70          75
Leu Val Thr Val Ser Ser
          80

```

15 <210> 42  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20 <400> 42

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1          5          10          15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
          20          25          30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
          35          40          45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
          50          55          60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          65          70          75
Val Thr Val Ser Ser
          80

```

<210> 43  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 43

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1           5           10           15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
           20           25           30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
           35           40           45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
           50           55           60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
           65           70           75

Thr Val Ser Ser
    
```

10

<210> 44  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 44

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1           5           10           15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
           20           25           30
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
           35           40           45
Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
           50           55           60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
           65           70           75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           80           85
    
```

20

<210> 45  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 45

ES 2 565 208 T3

```

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

```

<210> 46  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 46

```

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

```

<210> 47  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 47

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1                    5                      10                15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
                20                      25                30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
                35                      40                45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
                50                      55                60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                65                      70                75
Thr Val Ser Ser

```

ES 2 565 208 T3

<210> 48  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 48

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1           5           10
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
           20           25           30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
           35           40
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
           50           55           60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
           65           70           75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           80           85
    
```

10

<210> 49  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 49

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1           5           10
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
           20           25           30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
           35           40
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
           50           55           60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
           65           70           75
Leu Val Thr Val Ser Ser
           80
    
```

25

<210> 50  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 50

ES 2 565 208 T3

```

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

```

5 <210> 51  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 51

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1                    5                      10                      15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
                20                      25                      30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp
                35                      40                      45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                50                      55                      60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                65                      70                      75
Thr Val Ser Ser

```

15 <210> 52  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 52

ES 2 565 208 T3

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

<210> 53  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 53

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

<210> 54  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 54

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

ES 2 565 208 T3

<210> 55  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 55

```

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

10

<210> 56  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 56

```

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

20

<210> 57  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 57

ES 2 565 208 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp  
 35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 65 70 75

Val Thr Val Ser Ser  
 80

<210> 58

<211> 79

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10 <400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp  
 35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 59

<211> 80

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

20 <400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 50 55 60

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys  
 80

ES 2 565 208 T3

<210> 60  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 60  
 10  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 20 25 30  
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val  
 50 55 60  
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75  
 Lys Val Glu Ile Lys  
 80  
 <210> 61  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 61  
 20  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 20 25 30  
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu  
 50 55 60  
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75  
 Lys Val Glu Ile Lys  
 80  
 <210> 62  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 62  
 30

ES 2 565 208 T3

**Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu**

**1 5 10 15**

**Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly**  
**20 25 30**

**Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser**  
**35 40 45**

**Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu**  
**50 55 60**

**Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr**  
**65 70 75**

**Lys Val Glu Ile Lys**  
**80**

<210> 63  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 63

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly**  
**1 5 10 15**

**Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser**  
**20 25**

<210> 64  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 64

**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val**  
**5 10**

<210> 65  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

30

<400> 65

**Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu**  
**1 5 10 15**

**Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

<210> 66  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

ES 2 565 208 T3

<400> 66

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
5 .10

<210> 67

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 68

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

20

<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

30

<400> 69

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
20 25 30

Tyr Cys

<210> 70

<211> 10

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

40

<400> 70

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
5 10

<210> 71

<211> 107

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 71

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

Ile Lys

5

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 72

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

Ile Lys

15

<210> 73

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 73

ES 2 565 208 T3

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

<210> 74  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 74

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

<210> 75  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20

<400> 75

ES 2 565 208 T3

```

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

Ile Lys Arg

```

5 <210> 76  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 76

```

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

Ile Lys Arg

```

15 <210> 77  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 77

ES 2 565 208 T3

```

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

Ile Lys Arg

```

5 <210> 78  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada  
 <400> 78

```

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

Ile Lys Arg

```

15 <210> 79  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20 <400> 79

ES 2 565 208 T3

```

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

Ile Lys Arg

```

5 <210> 80  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 80

```

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

```

Ile Lys Arg

15 <210> 81  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 81

```

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

Ile Lys Arg
    
```

5 <210> 82  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10 <400> 82

```

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

Ile Lys Arg
    
```

15 <210> 83  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

20 <400> 83

ES 2 565 208 T3

```

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

Ile Lys Arg

```

5 <210> 84  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 84

```

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

Ser Ser

```

15 <210> 85  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 85

ES 2 565 208 T3

```

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

5 <210> 86  
 <211> 2031  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

```

<400> 86
cgcggggtgt tctggtgtcc cccgccccgc ctctccaaaa agctacaccg 50
acggggaccg cggcgggctc ctccctcgcc ctcgcttcac ctcgggggt 100
ccgaatgctg ggagctcgga tgtccggttt cctgtgaggg ttttacctga 150
caccgcgccg ctttccccgg cactggctgg gagggcgccc tgcaaagttg 200
ggaacgcgga gccccggacc cgctcccgcc gcctccggct cggccagggg 250
gggtcgccgg gaggagcccc ggggagaggg accaggaggg gcccgcgccc 300
tcgcaggggc gcccgcgccc ccaccctgc ccccgccagc ggaccgggtc 350
cccacccccg gtccttcac catgcacttg ctgggcttct tctctgtggc 400
    
```

ES 2 565 208 T3

gtgttctctg ctgcgcgctg cgctgctccc gggtcctcgc gagggcggccg 450  
 ccgccggcgc cgcttgcgag tccggactcg acctctcgga cgcggagccc 500  
 gacgcgggcg aggccaaggc ttatgcaagc aaagatctgg aggagcagtt 550  
 acggctctgtg tccagtgtag atgaactcat gactgtactc taccagaat 600  
 attggaaaat gtacaagtgt cagctaagga aaggaggctg gcaacataac 650  
 agagaacagc ccaacctcaa ctcaaggaca gaagagacta taaaatttgc 700  
 tgcagcacat tataatacag agatcttgaa aagtattgat aatgagtgga 750  
 gaaagactca atgcatgcca cgggaggtgt gtatagatgt ggggaaggag 800  
 tttggagtcg cgacaaacac cttctttaa cctccatgtg tgtccgtcta 850  
 cagatgtggg ggttgctgca atagtgggg gctgcagtgc atgaacacca 900  
 gcacgagcta cctcagcaag acgttatttg aaattacagt gcctctctct 950  
 caaggcccca aaccagtaac aatcagtttt gccaatcaca cttcctgccg 1000  
 atgcatgtct aaactggatg tttacagaca agttcattcc attattagac 1050  
 gttccctgcc agcaacacta ccacagtgtc aggcagcgaa caagacctgc 1100  
 cccaccaatt acatgtggaa taatcacatc tgcagatgcc tggctcagga 1150  
 agattttatg ttttcctcgg atgctggaga tgactcaaca gatggattcc 1200  
 atgacatctg tggaccaaac aaggagctgg atgaagagac ctgtcagtgt 1250  
 gtctgcagag cggggcttcg gcctgccagc tgtggacccc acaaagaact 1300  
 agacagaaac tcatgccagt gtgtctgtaa aaacaaactc ttcccagcc 1350  
 aatgtggggc caaccgagaa tttgatgaaa acacatgcca gtgtgtatgt 1400  
 aaaagaacct gcccagaaa tcaacccta aatcctggaa aatgtgcctg 1450  
 tgaatgtaca gaaagtccac agaaatgctt gttaaaagga aagaagtcc 1500  
 accaccaaac atgcagctgt tacagacggc catgtacgaa ccgccagaag 1550  
 gcttgtgagc caggatthtc atatagttaa gaagtgtgtc gttgtgtccc 1600  
 ttcattattg aaaagaacc aatgagcta agattgtact gttttccagt 1650  
 tcatcgattt tctattatgg aaaactgtgt tgccacagta gaactgtctg 1700  
 tgaacagaga gacccttgtg ggtccatgct aacaagaca aaagtctgtc 1750  
 tttcctgaac catgtggata actttacaga aatggactgg agctcatctg 1800  
 caaaaggcct cttgtaaaga ctggthttct gccaatgacc aaacagccaa 1850  
 gattttcctc ttgtgatttc tttaaaagaa tgactatata atttatttcc 1900  
 actaaaaata ttgtttctgc attcattttt atagcaacaa caattggtaa 1950  
 aactcactgt gatcaatatt tttatatcat gcaaatatg tttaaaataa 2000  
 aatgaaaatt gtattaaaaa aaaaaaaaaa a 2031

ES 2 565 208 T3

<211> 419  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> secuencia sintetizada

<400> 87

```

Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala
  1          5          10          15

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala
          20          25          30

Ala Phe Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala
          35          40          45

Gly Glu Ala Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu
          50          55          60

Arg Ser Val Ser Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro
          65          70          75

Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp
          80          85          90

Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu
          95          100          105

Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys
          110          115          120

Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu
          125          130          135

Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr
          140          145          150

Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys
          155          160          165

Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
          170          175          180

Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln Gly
          185          190          195

Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
          200          205          210

Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile
          215          220          225

Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
          230          235          240

Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg
          245          250          255

Cys Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp
          260          265          270
    
```

10

Asp Ser Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu  
 275 280 285

Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg  
 290 295 300

Pro Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys  
 305 310 315

Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala  
 320 325 330

Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg  
 335 340 345

Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys  
 350 355 360

Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys  
 365 370 375

Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg Pro Cys Thr Asn  
 380 385 390

Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser Glu Glu Val  
 395 400 405

Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met Ser  
 410 415

<210> 88  
 <211> 419  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 88

Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala  
 20 25 30

Ala Phe Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala  
 35 40 45

Gly Glu Ala Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu  
 50 55 60

Arg Ser Val Ser Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro  
 65 70 75

Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp  
 80 85 90

Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu  
 95 100 105

Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys  
 110 115 120

Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu  
 125 130 135

Val Ser Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr  
 140 145 150

Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys  
 155 160 165

Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr  
 170 175 180

Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln Gly  
 185 190 195

Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg  
 200 205 210

Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile  
 215 220 225

Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn  
 230 235 240

Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg  
 245 250 255

Cys Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp  
 260 265 270

Asp Ser Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu  
 275 280 285

Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg  
 290 295 300

Pro Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys  
 305 310 315

Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala  
 320 325 330

Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg  
 335 340 345

Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys  
 350 355 360

Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys  
 365 370 375

Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg Pro Cys Thr Asn  
 380 385 390

Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser Glu Glu Val  
 395 400 405

Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met Ser  
 410 415

<210> 89  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada

5

10

ES 2 565 208 T3

<400> 89

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
20 25 30

Tyr Cys

<210> 90

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 90

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
1 5 10 15

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

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 91

Gly Phe Ile Ser Pro Gly Val Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15

Val Lys Gly

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti factor C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C) aislado en el que el anticuerpo comprende seis HVR:
- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
  - (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
  - (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
  - 10 (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27;
  - (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; y
  - (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 a 2, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región Fc con una sustitución de aminoácido en la posición 297 en alanina de acuerdo con el sistema de numeración EU.
- 20 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región Fc con una sustitución de aminoácido en la posición 265 en alanina de acuerdo con el sistema de numeración EU.
- 25 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

Clon n.º	H1	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
VC1	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.1	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.2	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.3	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.4	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.5	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.6	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.7	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.8	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.9	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.10	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.11	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.1	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.2	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.3	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.4	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.5	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.6	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.8	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.9	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC1.12.10	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	
VC3	G	F	T	F	T	N	T	D	I	H	
VC4	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	
VC4.2	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	
VC4.3	G	F	T	F	T	Y	S	W	I	H	
VC4.4	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	
VC4.5	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	

**FIG. 1A**

Clon n.º	H2	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
VC1	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.1	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.2	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.3	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.4	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.5	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.6	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.7	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.8	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.9	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.10	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.11	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.1	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.2	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.3	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.4	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.5	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.6	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.8	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.9	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC1.12.10	A	W	I	S	P	Y	V	G	F	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC3	A	W	I	S	P	S	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
VC4	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.2	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.3	G	F	I	S	P	G	V	G	Y	S	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.4	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.5	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

**FIG. 1B**

Clon n.º	L1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
VC1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.5	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.7	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.9	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.10	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.11	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.5	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.9	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC1.12.10	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC4.2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC4.3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC4.4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
VC4.5	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	

FIG. 1D

Clon n.º	H3	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	101	102
VC1	A	R	L	F	E	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.1	A	R	L	F	K	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.2	A	R	L	F	E	I	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.3	V	R	L	F	E	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.4	V	R	L	F	G	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.5	A	R	L	W	E	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.6	V	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.7	A	R	L	F	D	I	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.8	T	R	L	F	T	I	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.9	S	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.10	V	R	L	F	G	I	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.11	V	R	L	Y	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.1	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.2	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.3	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.4	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.5	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.6	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.8	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.9	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC1.12.10	A	R	L	F	D	V	I	F	--	--	--	--	--	--	D	Y
VC3	A	R	W	R	D	Y	R	F	G	G	V	--	--	M	D	Y
VC4	A	R	D	A	D	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y	Y
VC4.2	A	R	D	A	D	Y	A	Y	A	W	W	A	F	D	Y	Y
VC4.3	A	R	D	A	D	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y	Y
VC4.4	A	R	D	V	D	Y	Y	Y	A	W	W	A	L	D	Y	Y
VC4.5	A	R	D	A	D	Y	K	Y	A	F	W	A	F	D	Y	Y

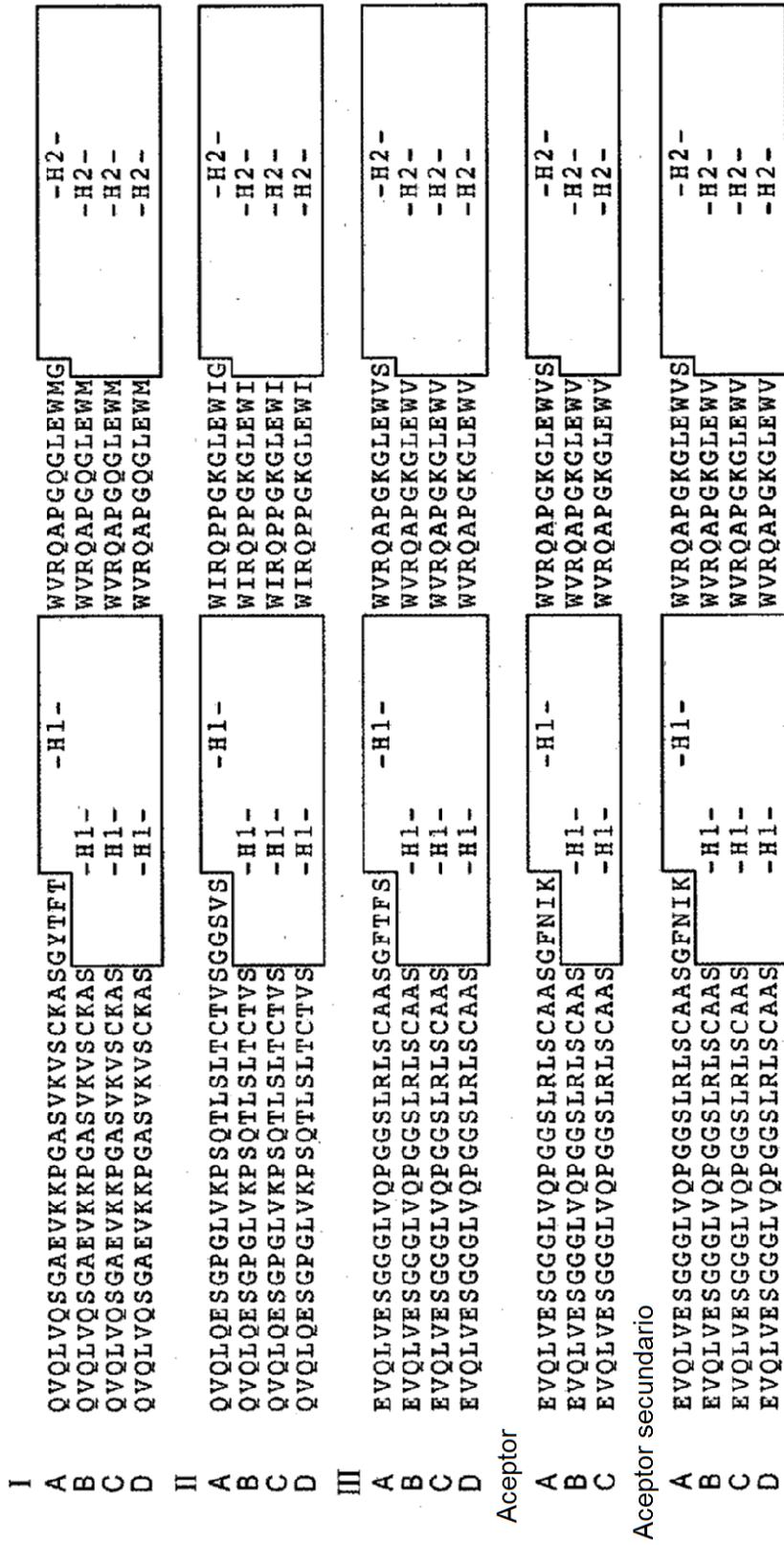
FIG. 1C

Clon n.º	L2	50	51	52	53	54	55	56
VC1	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.1	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.2	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.3	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.4	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.5	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.6	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.7	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.8	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.9	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.10	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.11	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.1	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.2	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.3	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.4	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.5	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.6	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.8	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.9	S	A	S	F	L	Y	S	
VC1.12.10	S	A	S	F	L	Y	S	
VC3	S	A	S	F	L	Y	S	
VC4	S	A	S	F	L	Y	S	
VC4.2	S	A	S	F	L	Y	S	
VC4.3	S	A	S	F	L	Y	S	
VC4.4	S	A	S	F	L	Y	S	
VC4.5	S	A	S	F	L	Y	S	

**FIG. 1E**

Clon n.º	L3	89	90	91	92	93	94	95	96	97
VC1	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.1	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.2	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.3	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.4	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.5	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.6	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.7	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.8	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.9	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.10	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.11	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.12	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC1.12.1	Q	Q	S	Y	N	I	P	P	T	
VC1.12.2	Q	Q	S	Y	W	T	P	L	T	
VC1.12.3	Q	Q	T	Y	A	I	P	P	T	
VC1.12.4	Q	Q	S	Y	T	S	P	T	T	
VC1.12.5	Q	Q	S	Y	T	T	P	T	T	
VC1.12.6	Q	Q	S	Y	N	T	P	P	T	
VC1.12.8	Q	Q	S	Y	I	T	P	P	T	
VC1.12.9	Q	Q	S	Y	T	I	P	P	T	
VC1.12.10	Q	Q	S	Y	Y	S	P	L	T	
VC3	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC4	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC4.2	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC4.3	Q	Q	T	Y	R	I	P	Y	T	
VC4.4	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
VC4.5	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	

**FIG. 1F**



**FIG. 2A**

I	A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 40
	B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 41
	C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 42
	D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 43
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 44
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 45
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 46
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 47
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 48
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 49
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 51
Aceptor					
	A	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 52
	B	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 53
	C	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 54
Aceptor secundario					
	A	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 55
	B	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 56
	C	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 57
	D	RFTISADTSSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 58

FIG. 2B

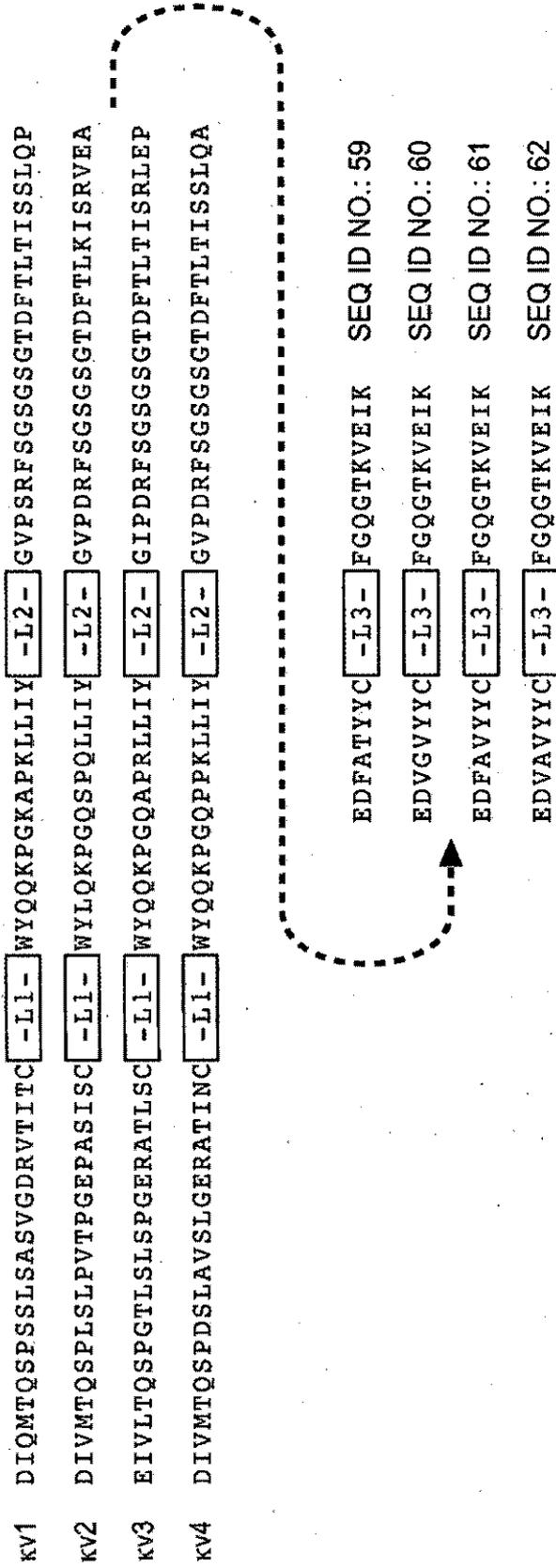


FIG. 3

Secuencias marco conservadas de la cadena ligera de hMab4D5-8

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO: 67)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup>  
(SEQ ID NO: 68)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup>  
(SEQ ID NO: 69)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO: 70)

Secuencias marco conservadas de la cadena pesada de hMab4D5-8

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEQ ID NO: 63)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup>  
(SEQ ID NO: 64)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
Met Asn<sup>82a</sup> Ser<sup>82b</sup> Leu<sup>82c</sup> Arg<sup>83</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup>  
(SEQ ID NO: 65)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEQ ID NO: 66)

**FIG. 4**

Secuencias marco conservadas de la cadena ligera de huMAB4D5-8 modificada en la posición 66 (subrayada)

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO: 67)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup>  
(SEQ ID NO: 68)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup>  
(SEQ ID NO: 89)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO: 70)

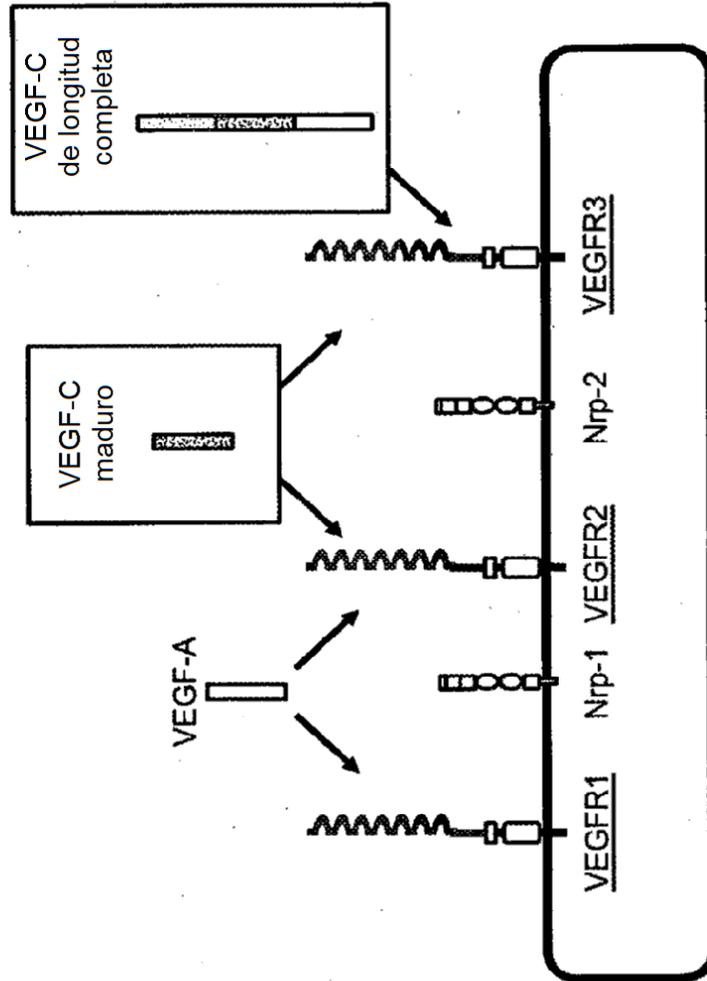
Secuencias marco conservadas de la cadena pesada de huMAB4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEQ ID NO: 63)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup>  
(SEQ ID NO: 64)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
Met Asn<sup>82a</sup> Ser<sup>82b</sup> Leu<sup>82c</sup> Arg<sup>83</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup>  
(SEQ ID NO: 90)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEQ ID NO: 66)

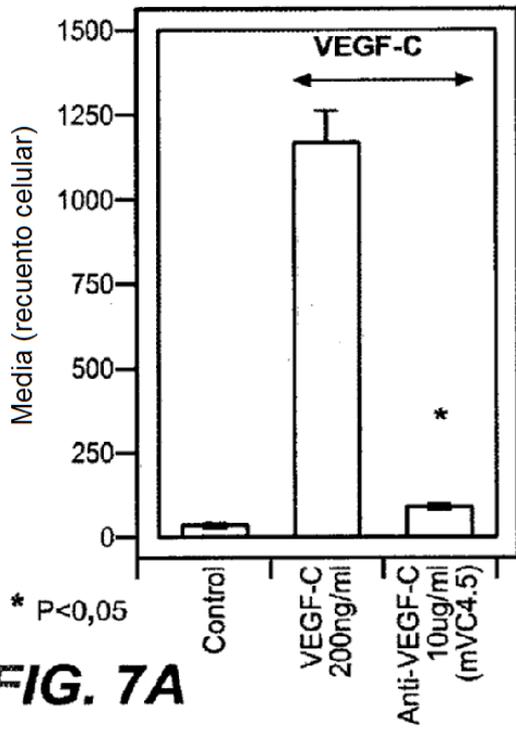
**FIG. 5**



**FIG. 6A**

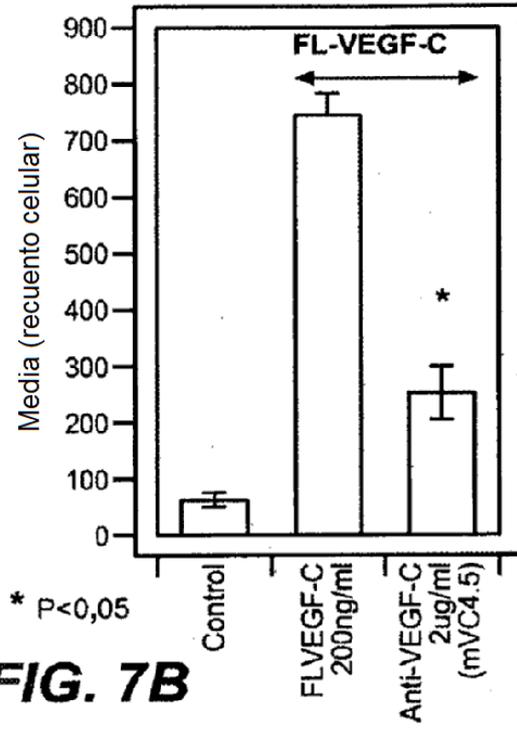


**FIG. 6B**

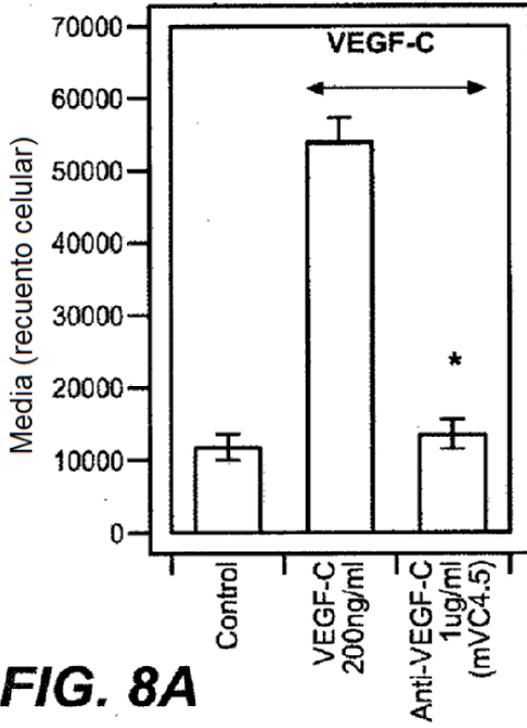


**FIG. 7A**

Condiciones

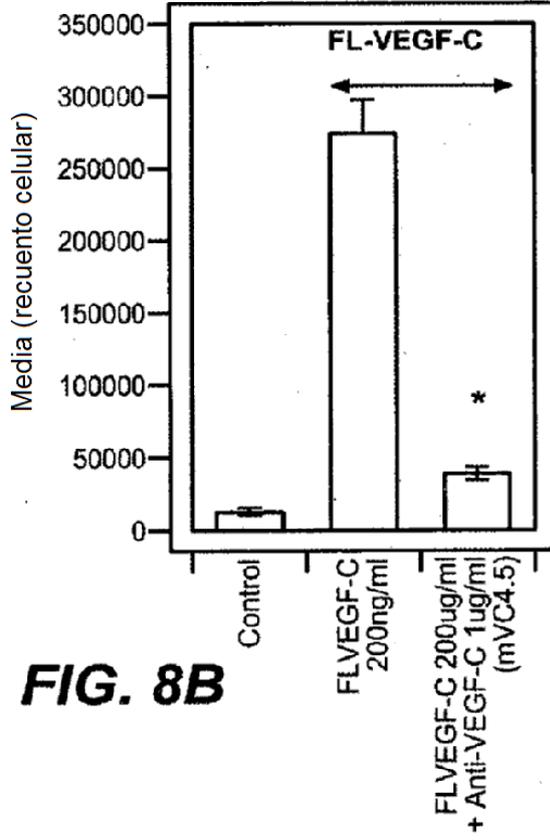


**FIG. 7B**

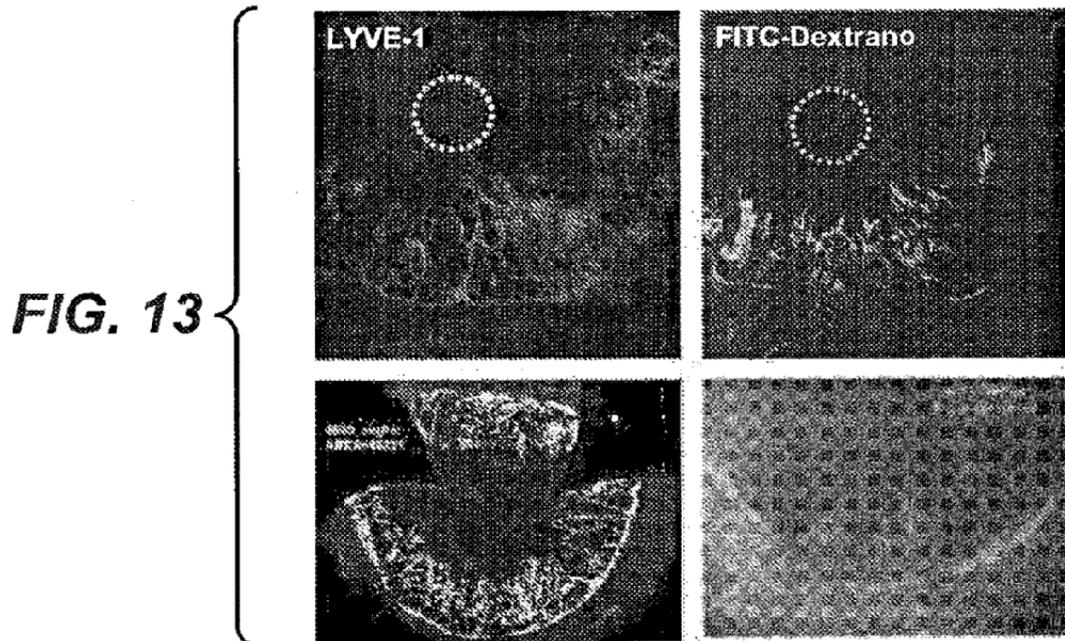
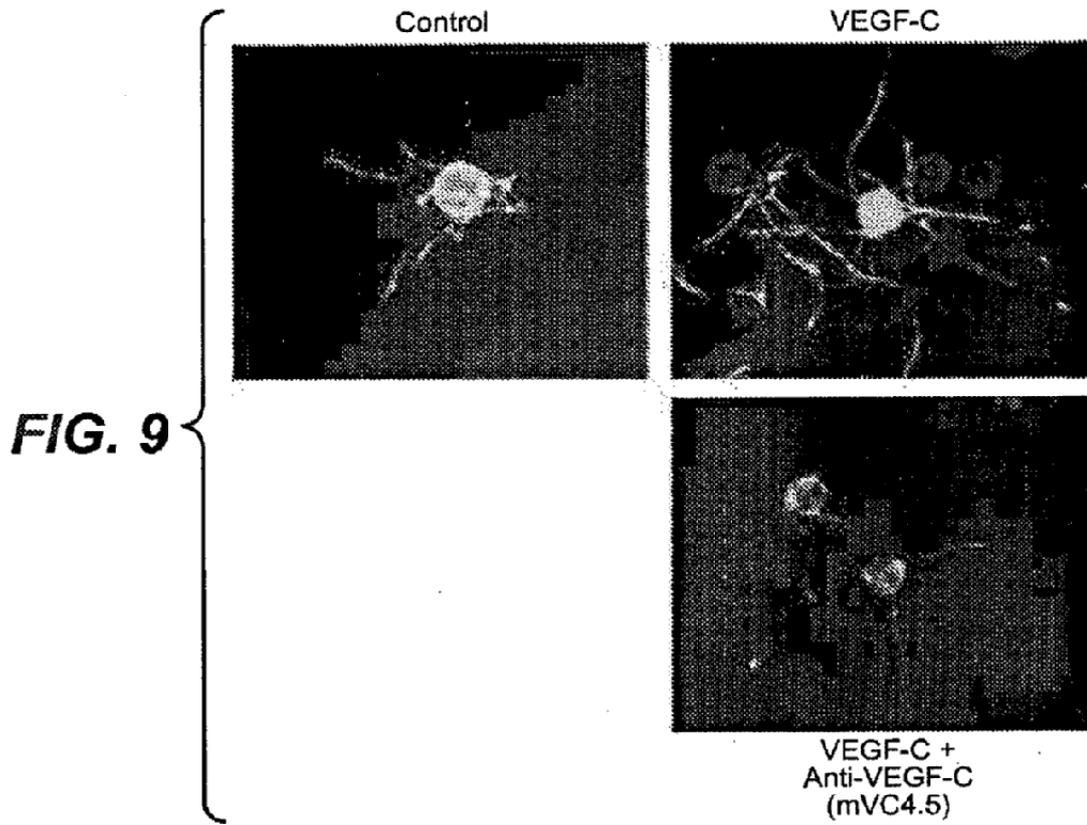


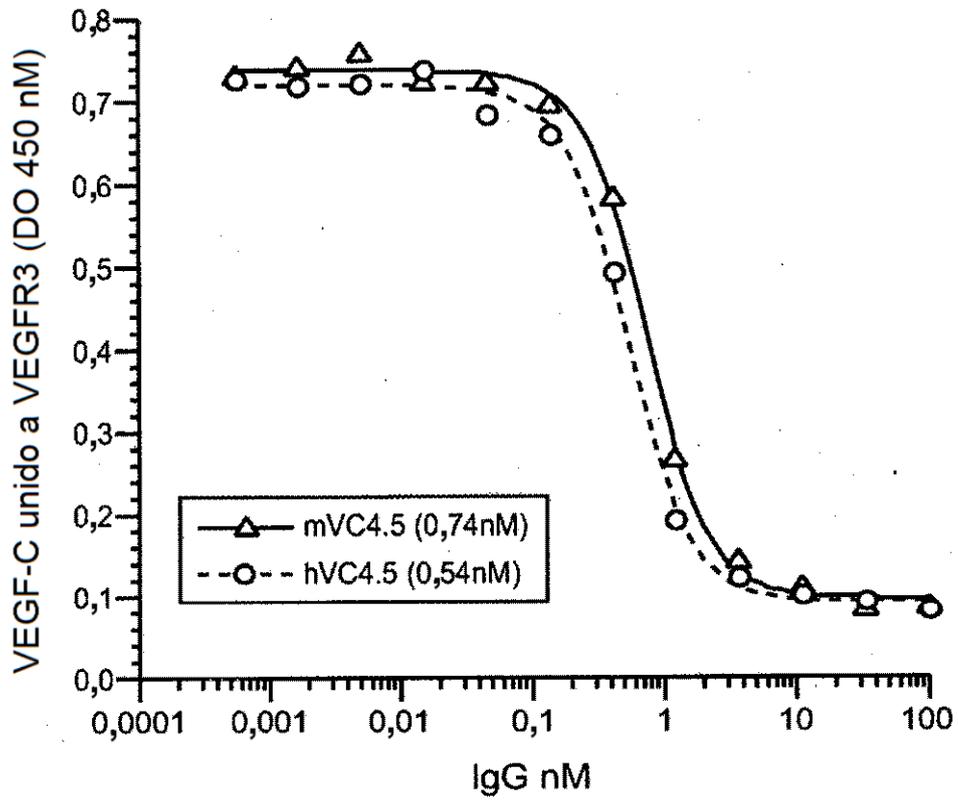
**FIG. 8A**

Condiciones

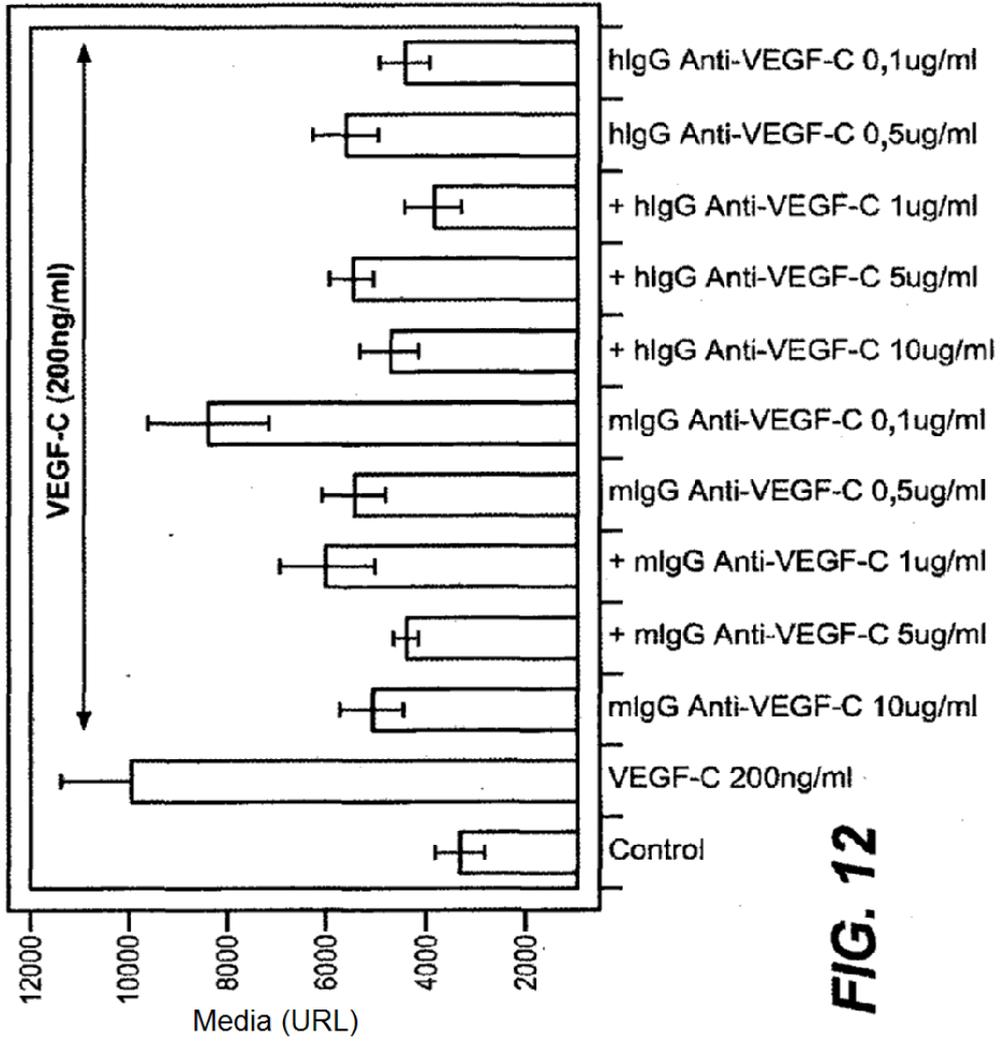


**FIG. 8B**

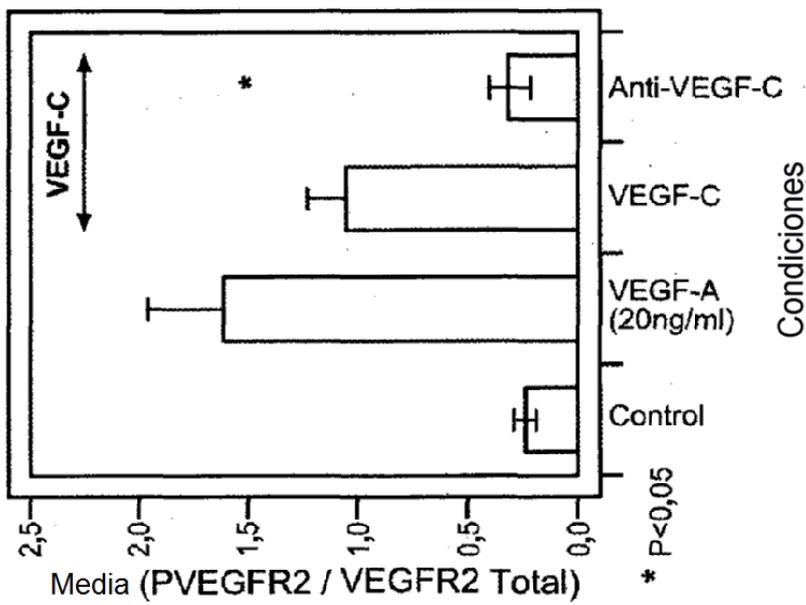




**FIG. 10**



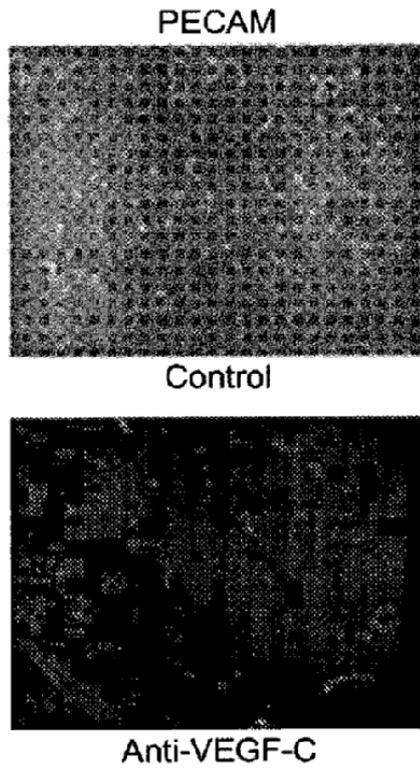
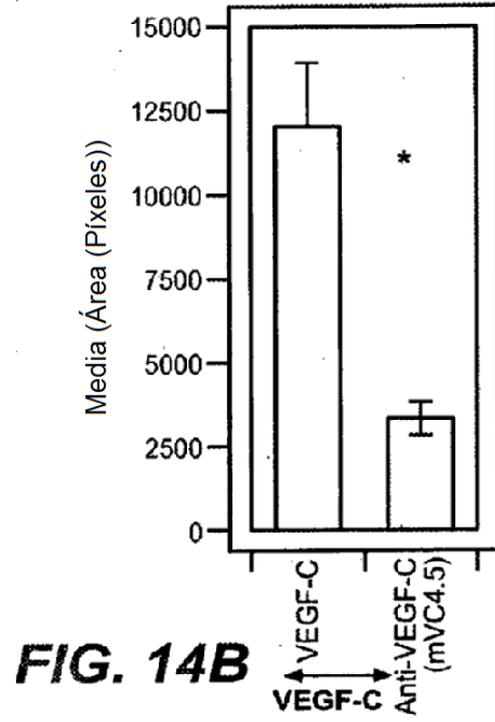
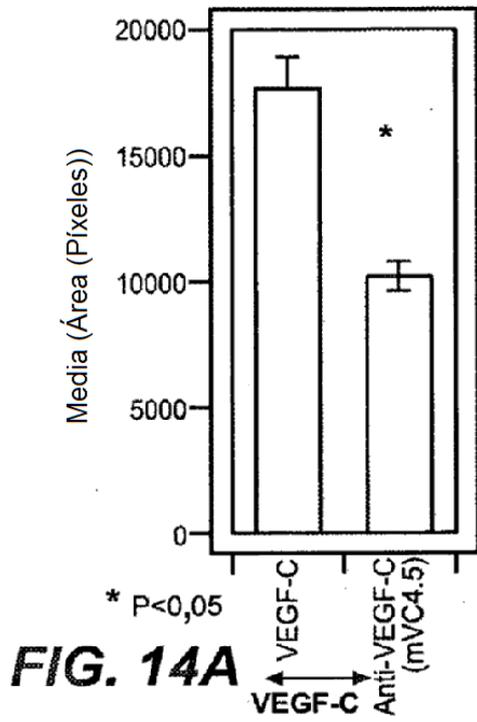
**FIG. 12**



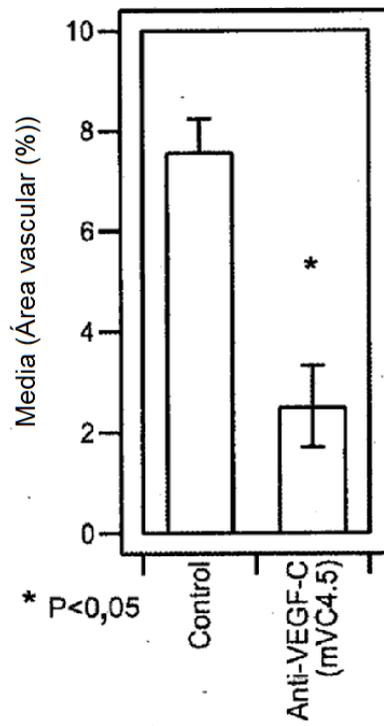
Condiciones

**FIG. 11**

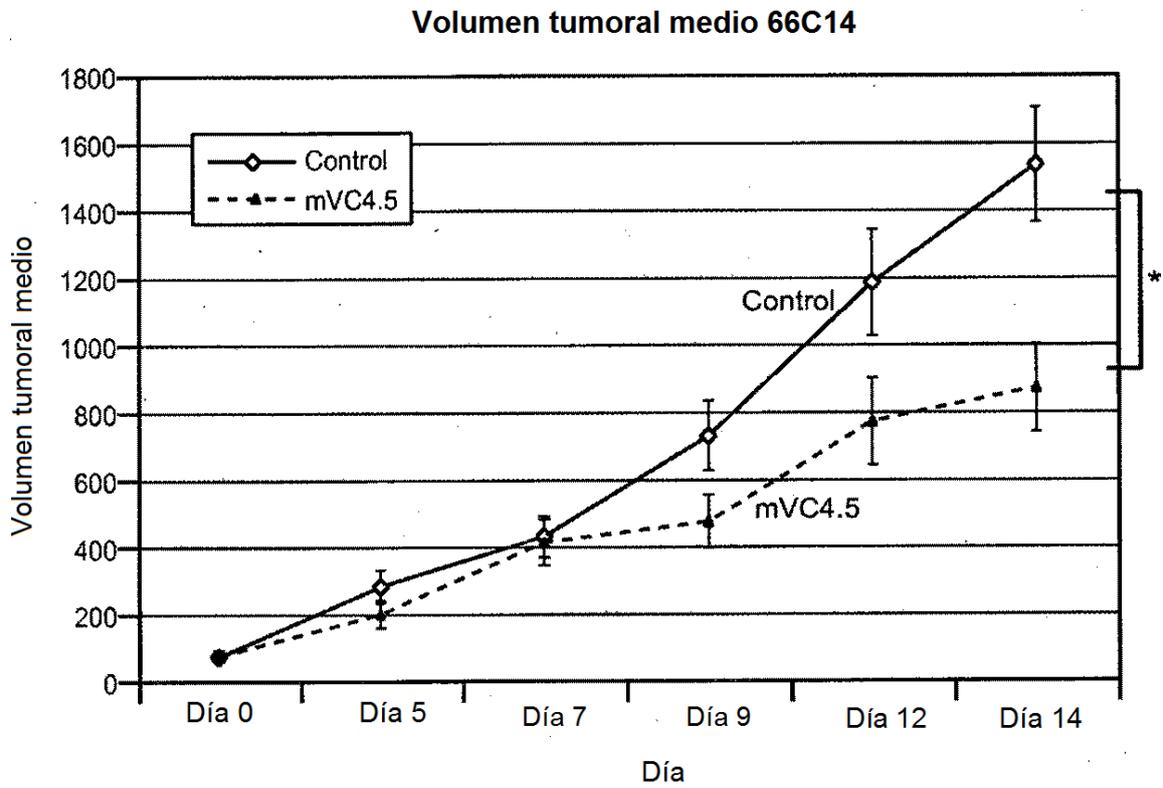
\* P < 0,05



**FIG. 15A**



**FIG. 15B**



**FIG. 16A**

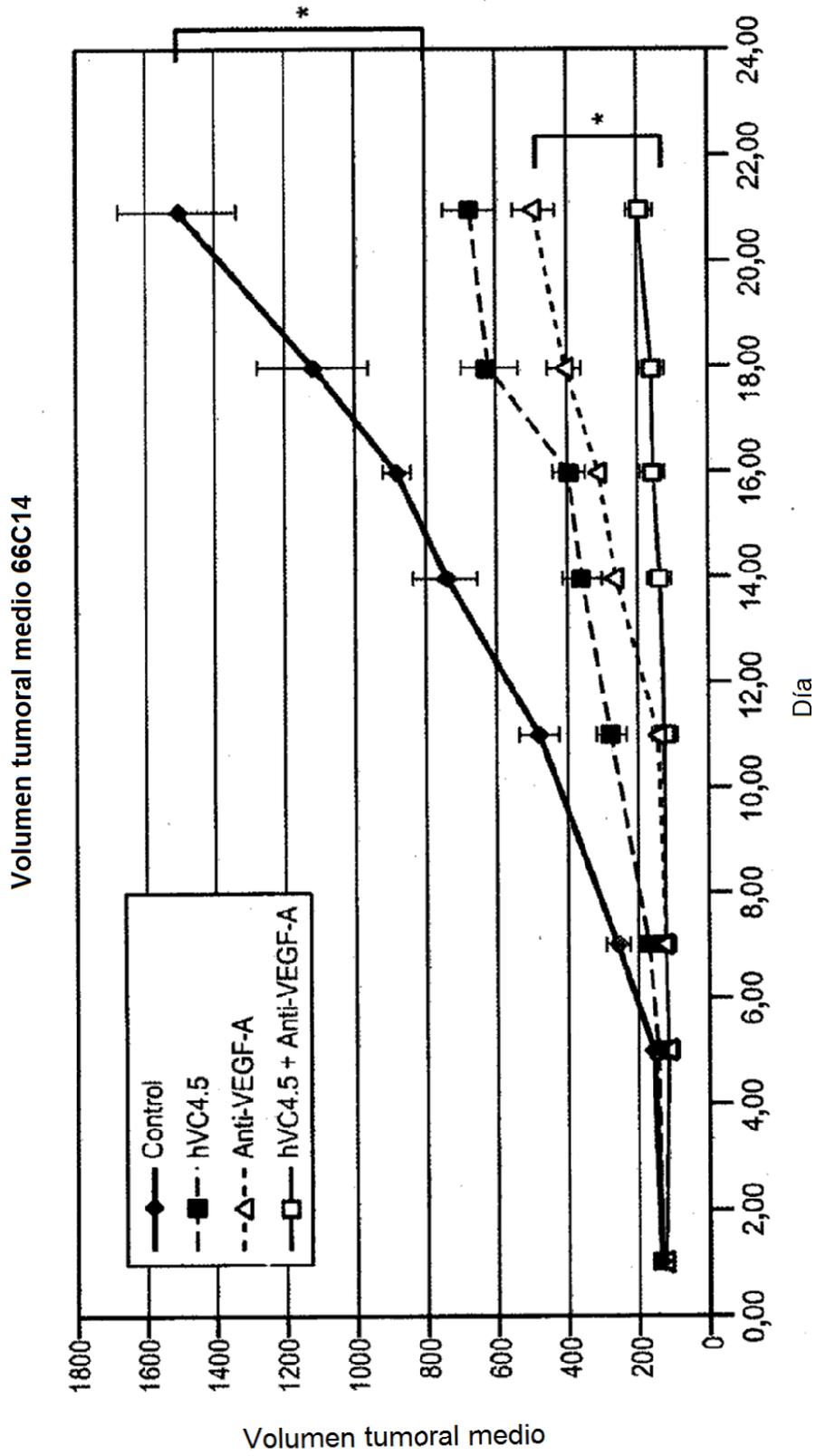


FIG. 16B

Gráfica de Kaplan-Meier de H460-e230

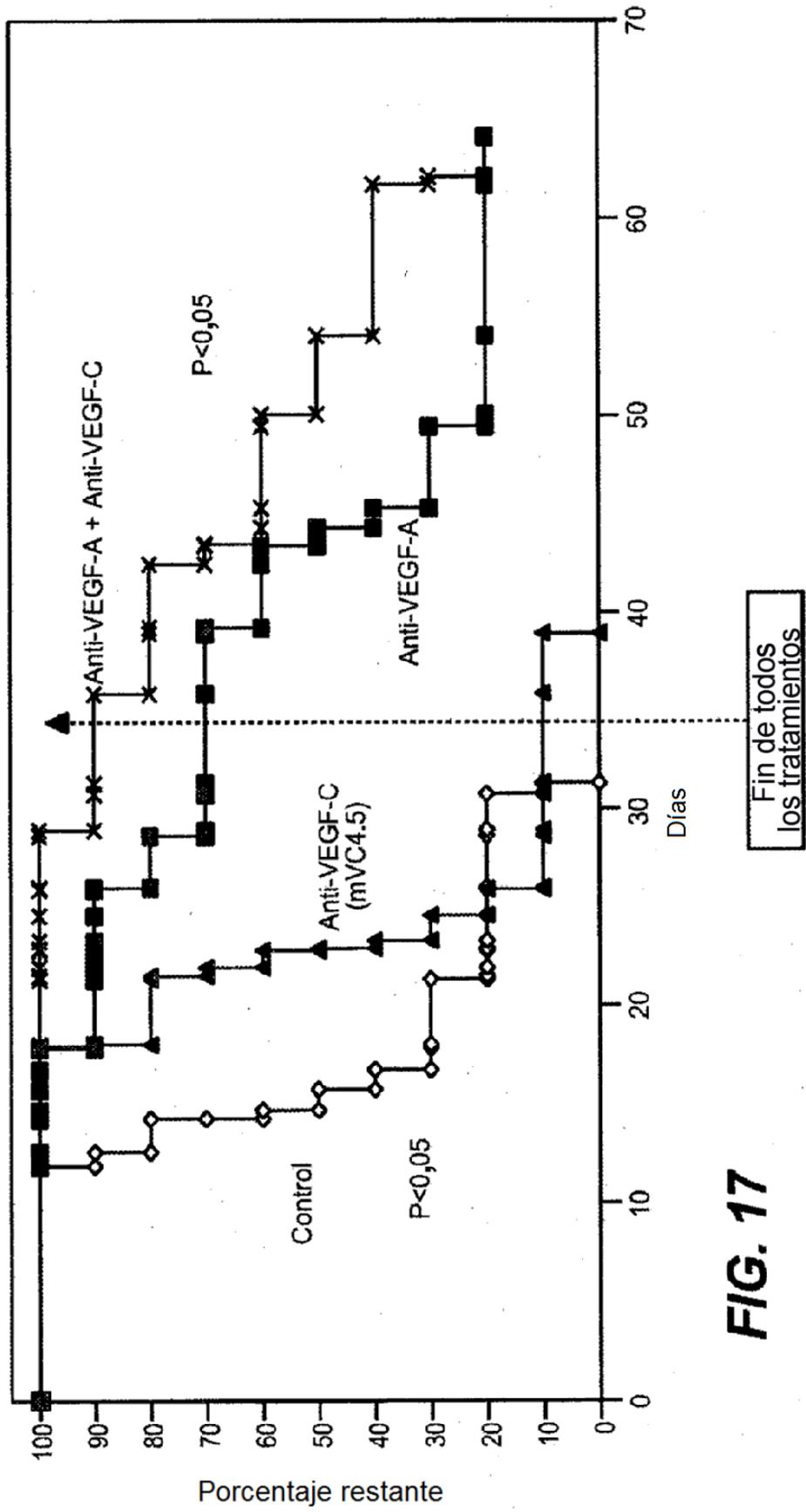
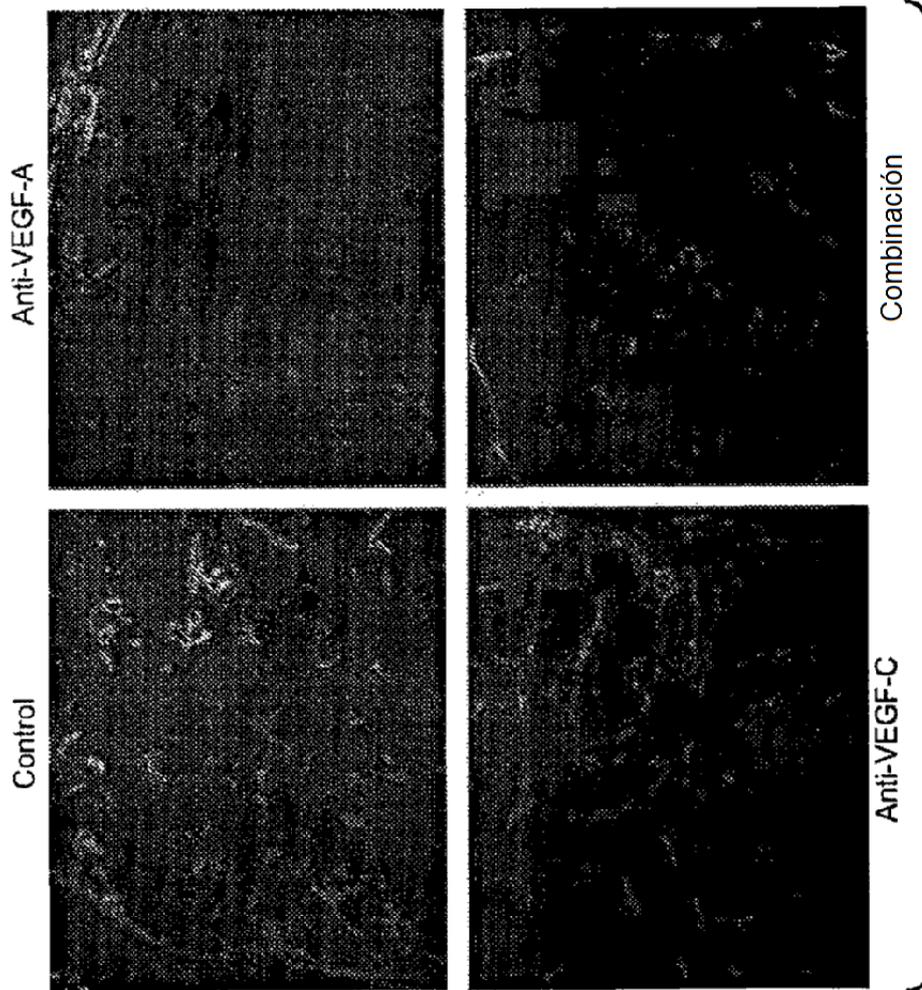
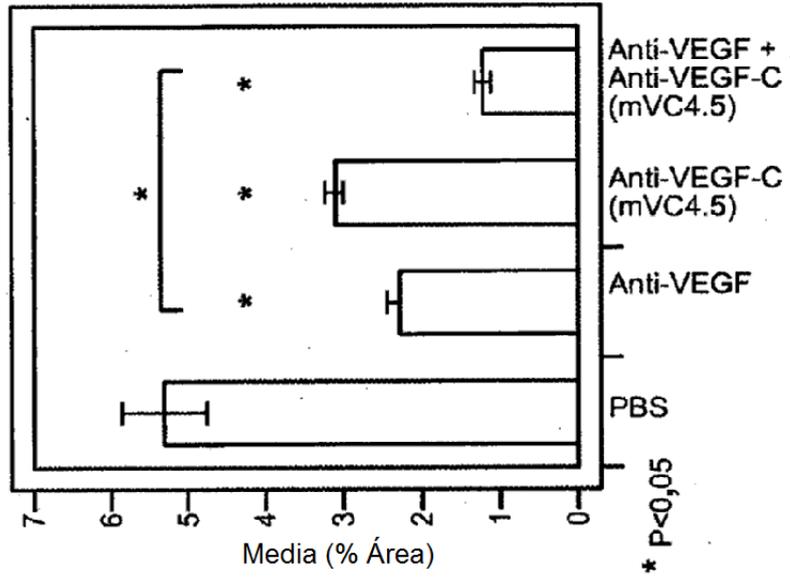


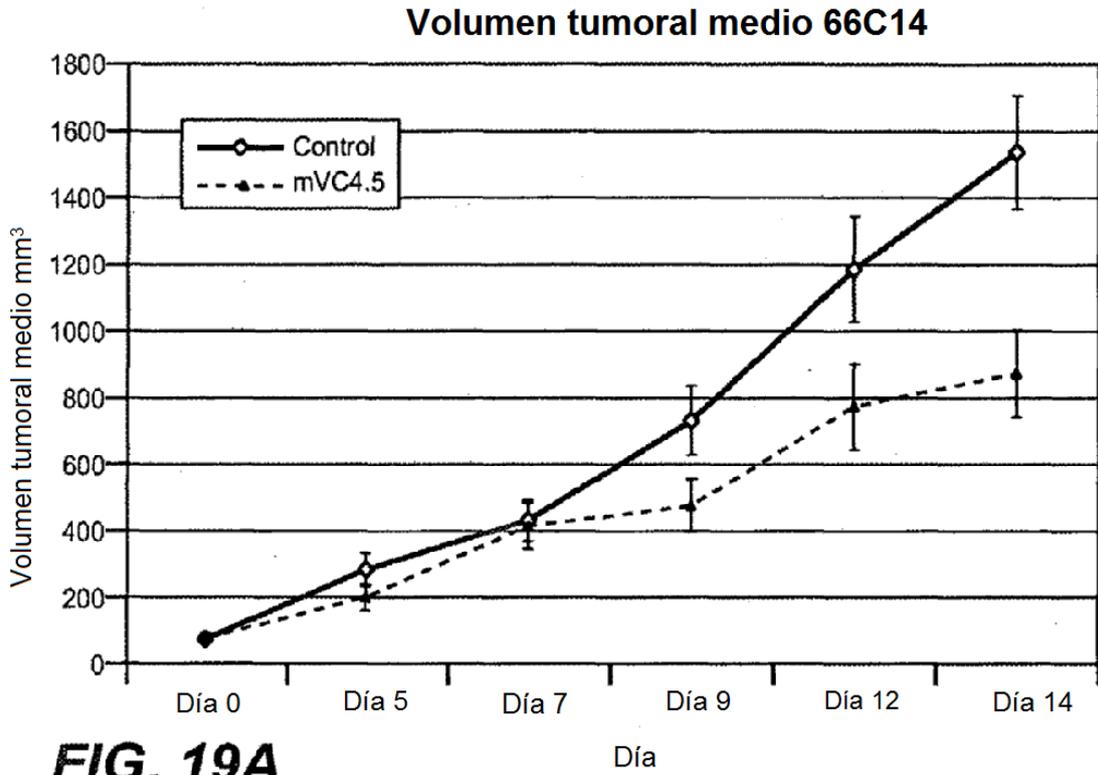
FIG. 17



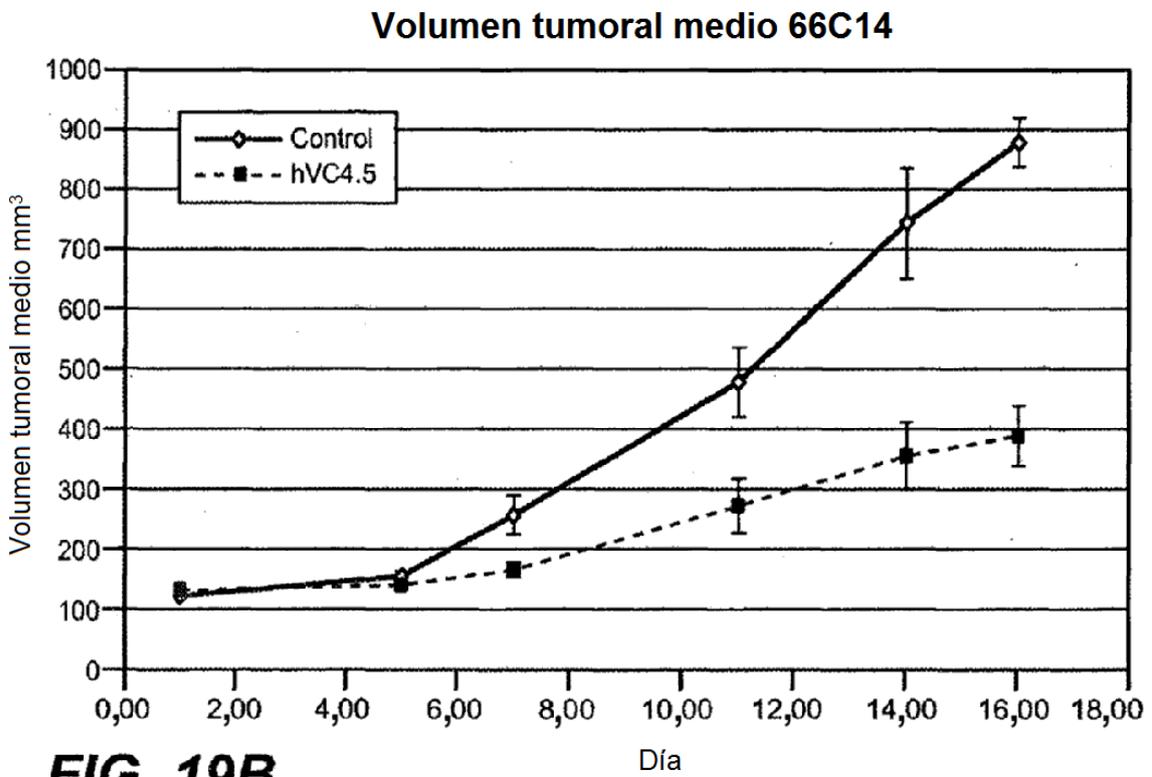
**FIG. 18A**



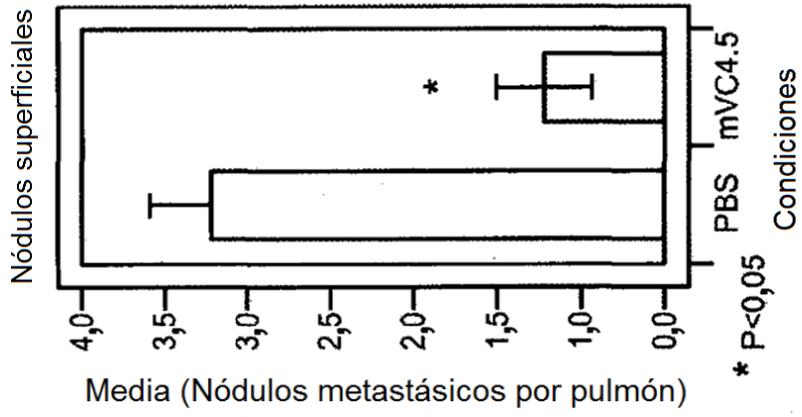
**FIG. 18B**



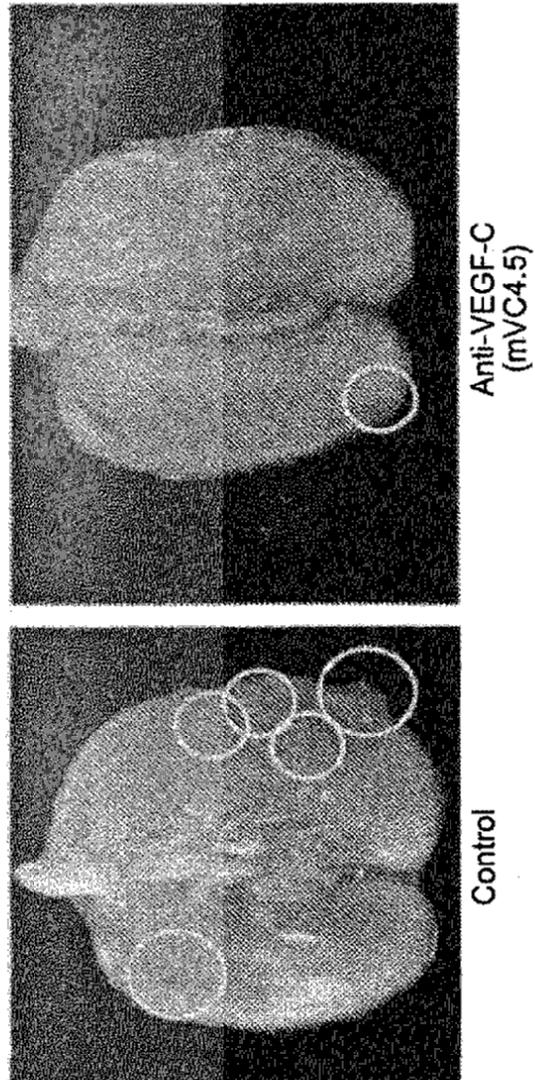
**FIG. 19A**

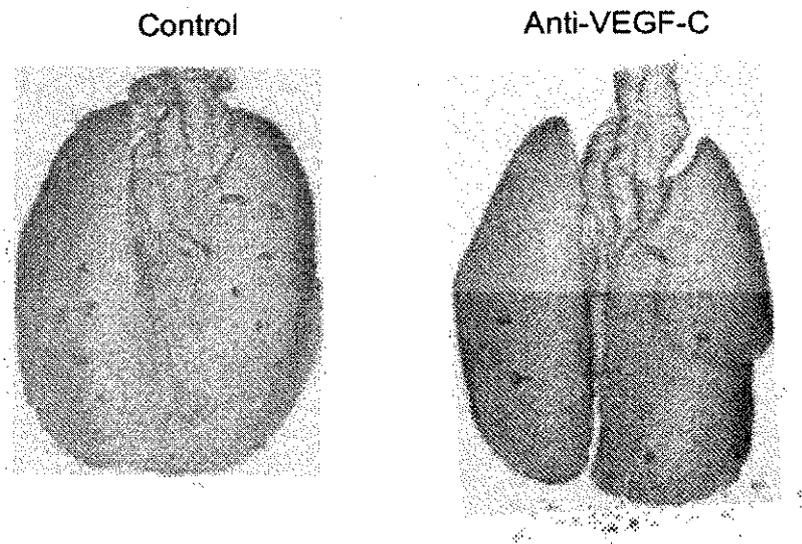


**FIG. 19B**

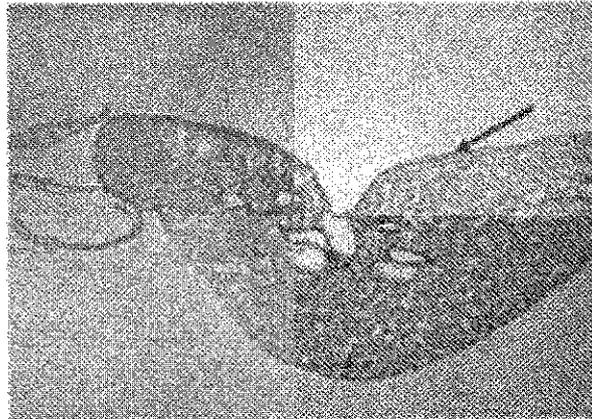


**FIG. 20B**

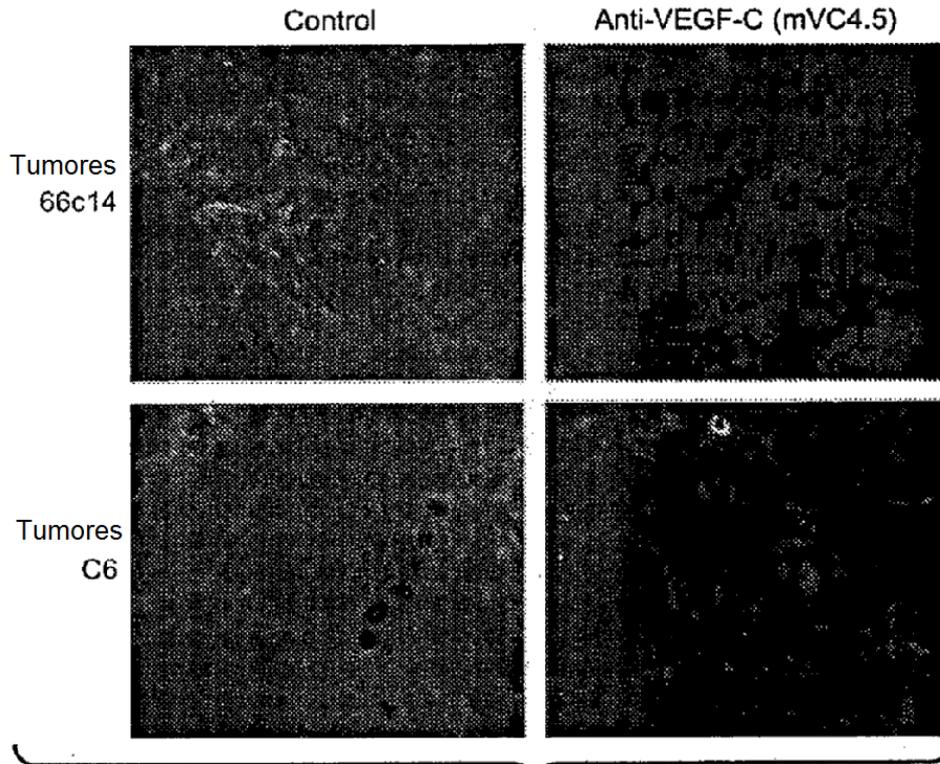




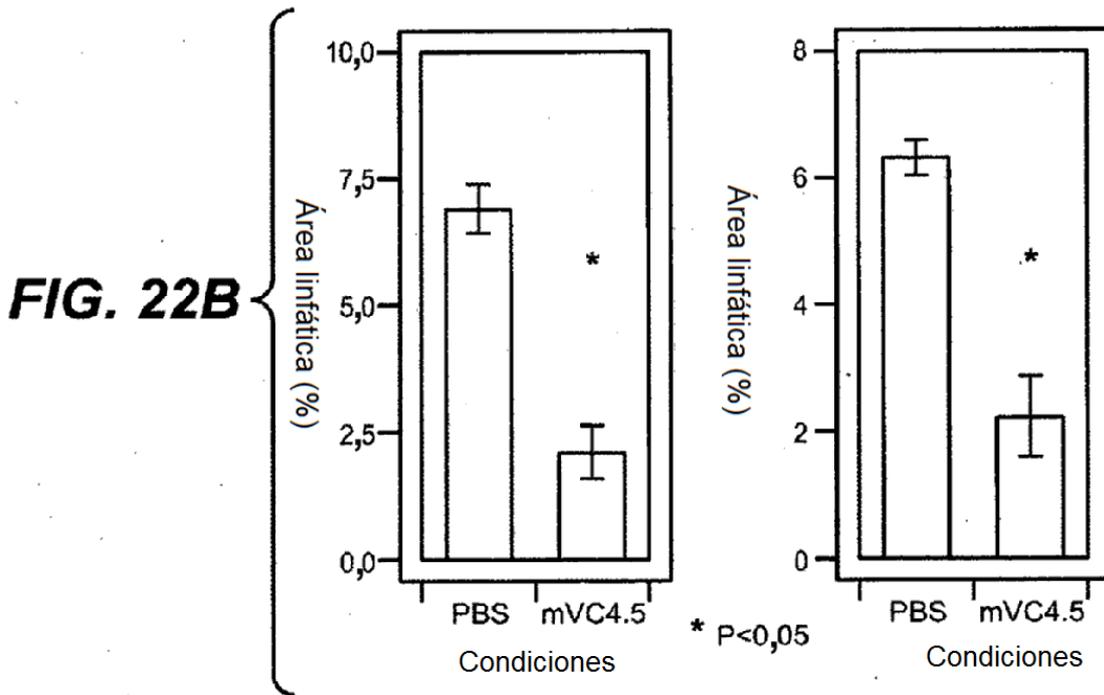
**FIG. 21A**



**FIG. 21B**



**FIG. 22A**



**FIG. 23**

No. Kabat VC1 VC3 VC4	CDR-L1										CDR-L2					CDR-L3											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T

No. Kabat VC1 VC3 VC4	CDR-H1										CDR-H2																	
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
	G	F	T	F	S	D	S	D	I	H	A	W	I	S	P	Y	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G

CDR-H3														
93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	101	102
A	R	L	F	E	V	I	F	-	-	-	-	-	D	Y
A	R	W	R	D	Y	R	F	G	G	V	-	M	D	Y
A	R	D	A	D	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y

**FIG. 24**

FIG. 25

No. Kabat	CDR-L1										CDR-L2						CDR-L3									
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96
VC4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC4.2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC4.3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC4.4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC4.5	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	S	Y	T	T	P	P	T

No. Kabat	CDR-H1										CDR-H2																	
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
VC4	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.2	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.3	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.4	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
VC4.5	G	F	T	F	T	D	N	W	I	H	G	V	I	S	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

No. Kabat	CDR-H3															
	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	101	102	
VC4	A	R	D	A	D	Y	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y
VC4.2	A	R	D	A	D	Y	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y
VC4.3	A	R	D	A	D	Y	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y
VC4.4	A	R	D	A	D	Y	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y
VC4.5	A	R	D	A	D	Y	Y	D	Y	A	G	W	A	F	D	Y

FIG. 26

No. Kabat	CDR-L1										CDR-L2						CDR-L3										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
VC1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.5	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.7	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.9	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.10	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.11	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T

**FIG. 27**

No. Kabat	CDR-L1										CDR-L2						CDR-L3										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
VC1.12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.12.1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	N	I	P	P	T
VC1.12.2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	W	T	P	L	T
VC1.12.3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	A	I	P	P	T
VC1.12.4	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	A	S	P	P	T
VC1.12.5	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.12.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.12.8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	N	I	P	P	T
VC1.12.9	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
VC1.12.10	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	Y	I	P	P	T

**FIG. 29**

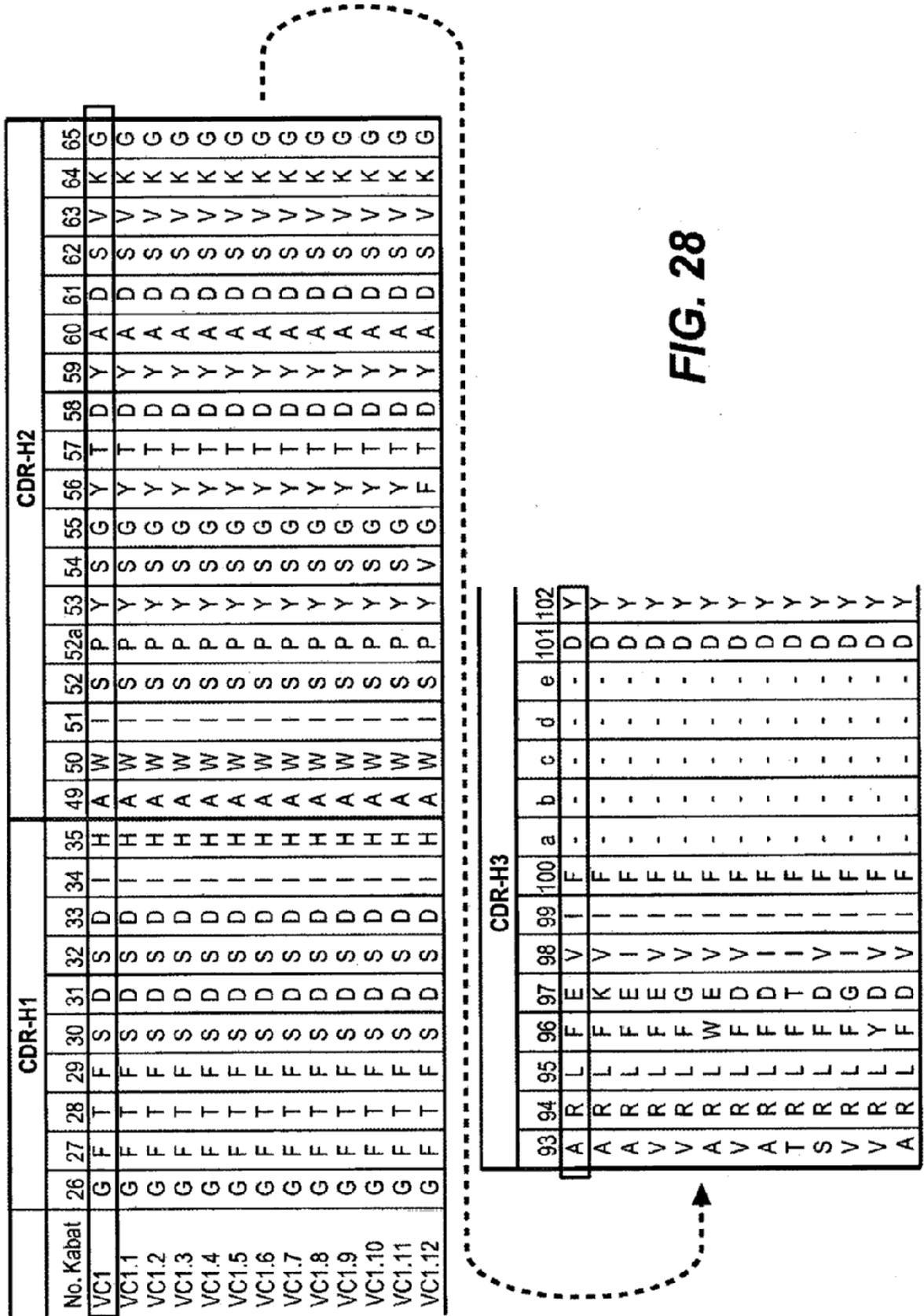


FIG. 28

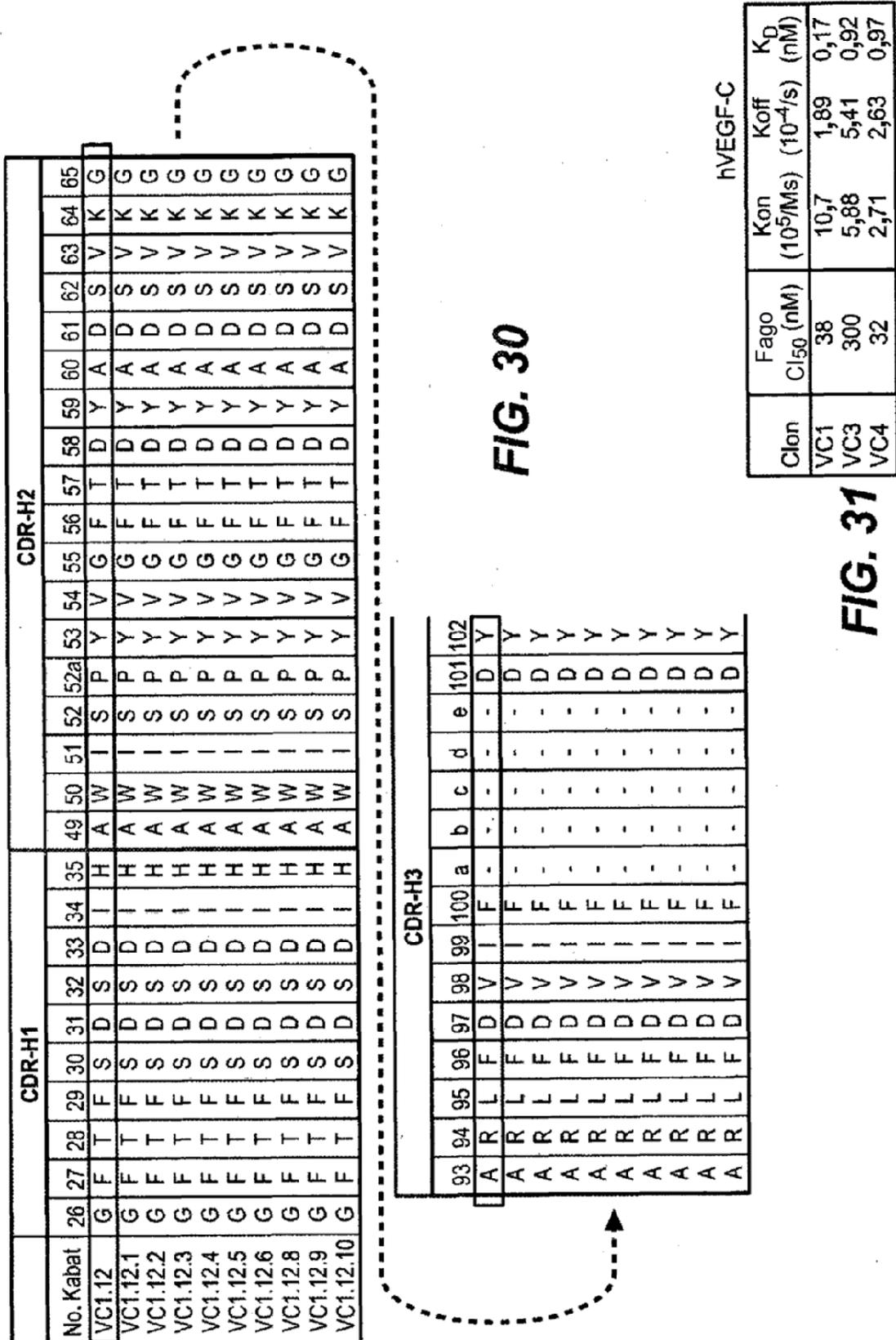


FIG. 30

FIG. 31

ELISA de bloqueo de receptor

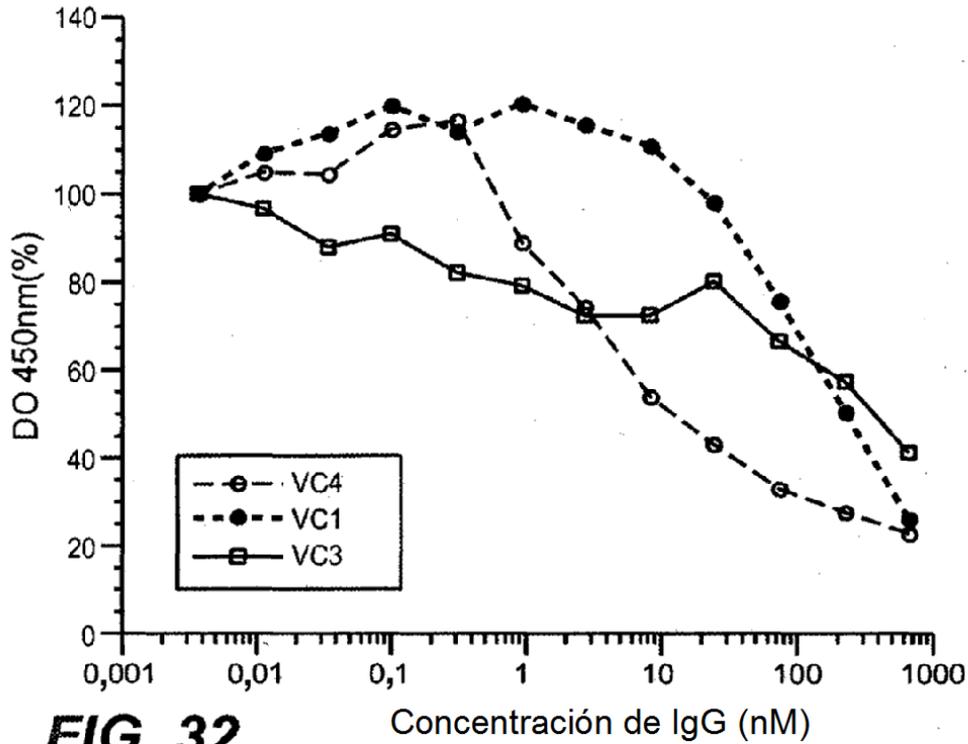


FIG. 32

	Fago Cl <sub>50</sub> (nM)
VC4	32±4,9
VC4.2	2,64±1,8
VC4.3	2,72±1,5
VC4.4	2,17±1,5
VC4.5	1,7±0,8

FIG. 33

VC4.5Fab	Biacore(Fab)		
	Kon	Koff	Kd(nM)
R&D VEGF-C	6,05E+04	1,67E-03	27,5
VEGF-C C137S	1,30E+05	1,04E-03	7,96

VC4.5hIgG1	Biacore (IgG1)		
	Kon	Koff	Kd(nM)
R&D VEGF-C	4,64E+04	6,60E-03	140
VEGF-C C137S	1,09E+05	1,20E-04	1,1

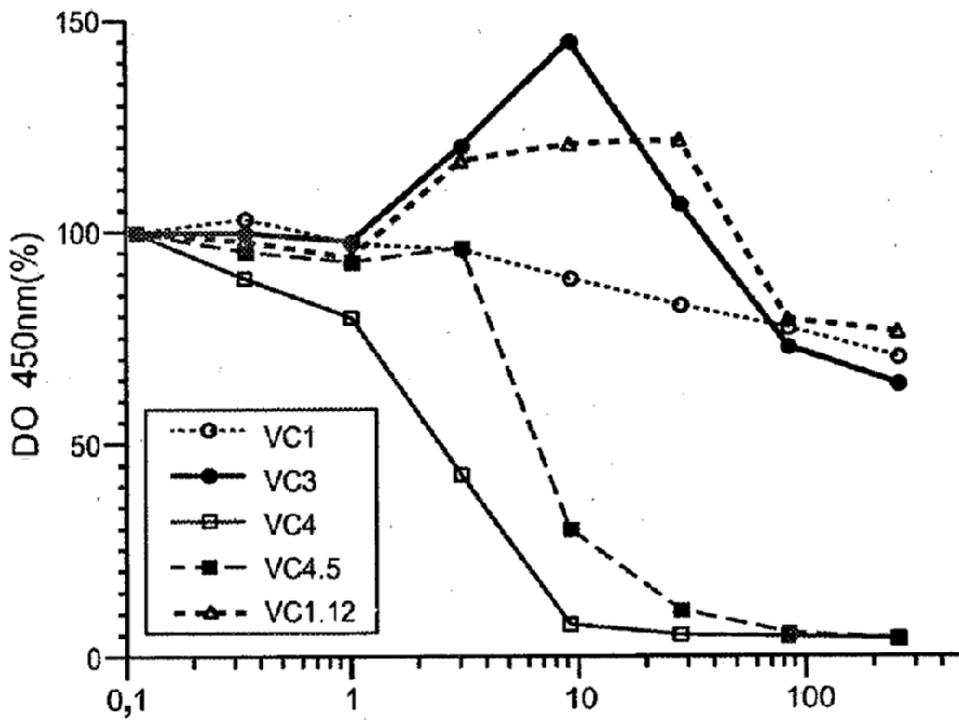
FIG. 34

	Fago Cl <sub>50</sub> (nM)
VC1	21,5±14
VC1.1	41,5±5,5
VC1.2	27,1±11,6
VC1.3	22,1±12,2
VC1.4	40,7±2,8
VC1.5	28±20
VC1.6	15,4±9,7
VC1.7	20±11,6
VC1.8	22,5±14
VC1.9	n/a
VC1.10	17±10,2
VC1.11	25,3±11,7
VC1.12	5,1±2

**FIG. 35**

	Fago Cl <sub>50</sub> (nM)
VC1.12	32,4±0,6
VC1.12.1	7,29±0,9
VC1.12.2	25,9±18,4
VC1.12.3	23±8,7
VC1.12.4	7,7±1,3
VC1.12.5	28,1±16
VC1.12.6	32,8±14
VC1.12.8	13,7±4,3
VC1.12.9	4,8±0,4
VC1.12.10	16,8±3,6
VC4.5	5,4±0,5

**FIG. 36**



**FIG. 37**

Concentración de IgG VC4.5 (nM)

No. Kabat 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

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

VC4.5	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q	D V S T A V A W Y Q
VC1.12	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q	D V S T A V A W Y Q

No. Kabat 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

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

VC4.5	Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P
VC1.12	Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P

No. Kabat 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

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

VC4.5	E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R
VC1.12	E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R

FIG. 38

No. Kabat 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A 36 37 38 39 40 41

Kabat - CDR H1  
 Chothia - CDR H1  
 Contact - CDR H1

VC4.5 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D N W I H W V R Q A P  
 VC1.12 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D S D I H W V R Q A P

No. Kabat 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 52 52 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79

Kabat - CDR H2  
 Chothia - CDR H2  
 Contact - CDR H2

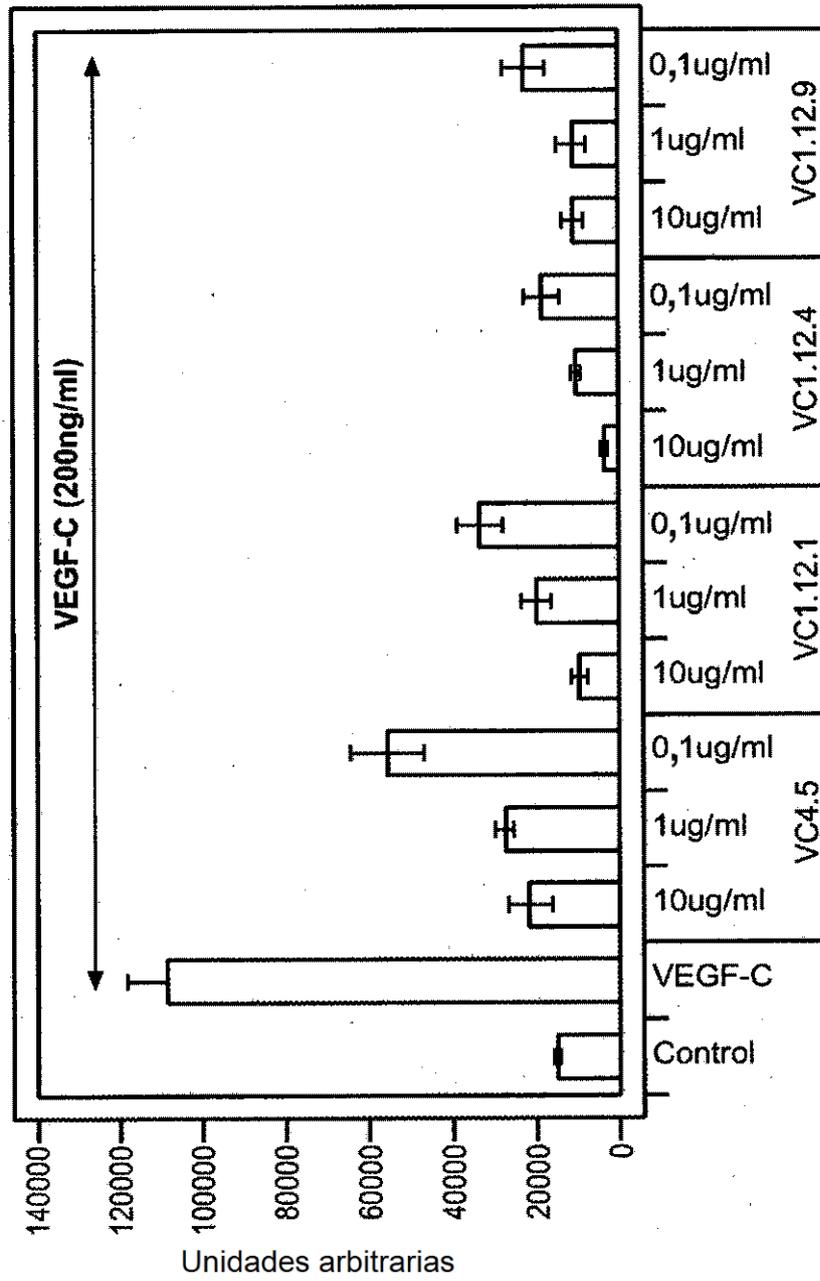
VC4.5 G K G L E W V G V I S P Y S G A T Y Y A D S S V X G R F T I S A D T S K N T A Y  
 VC1.12 G K G L E W V A W I S P Y V G F T D Y A D S S V X G R F T I S A D T S K N T A Y

No. Kabat 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

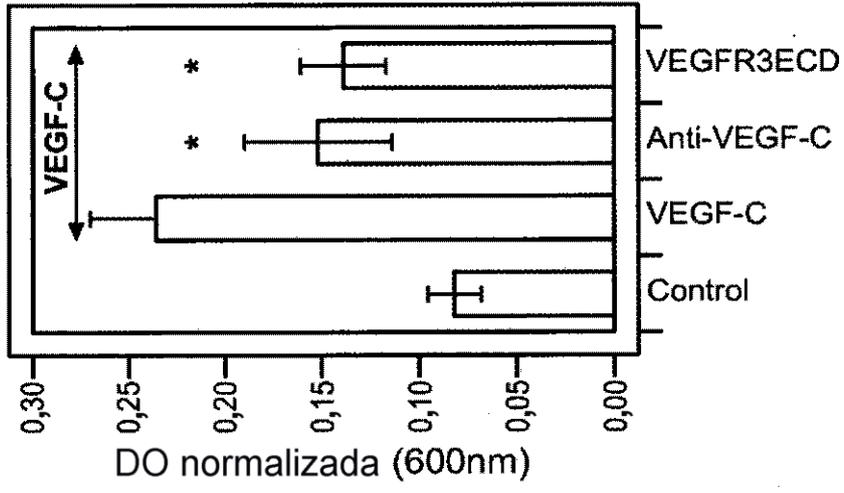
Kabat - CDR H3  
 Chothia - CDR H3  
 Contact - CDR H3

VC4.5 L Q M N S L R A E D F A V Y Y C A R D A D Y K Y A F W A F D Y W G Q G T L V T V S S  
 VC1.12 L Q M N S L R A E D F A V Y Y C A R L F D V I F D Y W G Q G T L V T V S S

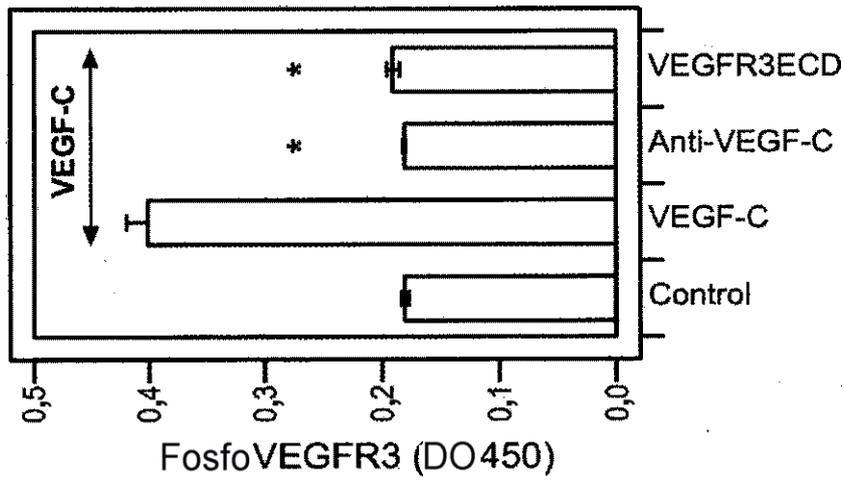
**FIG. 39**



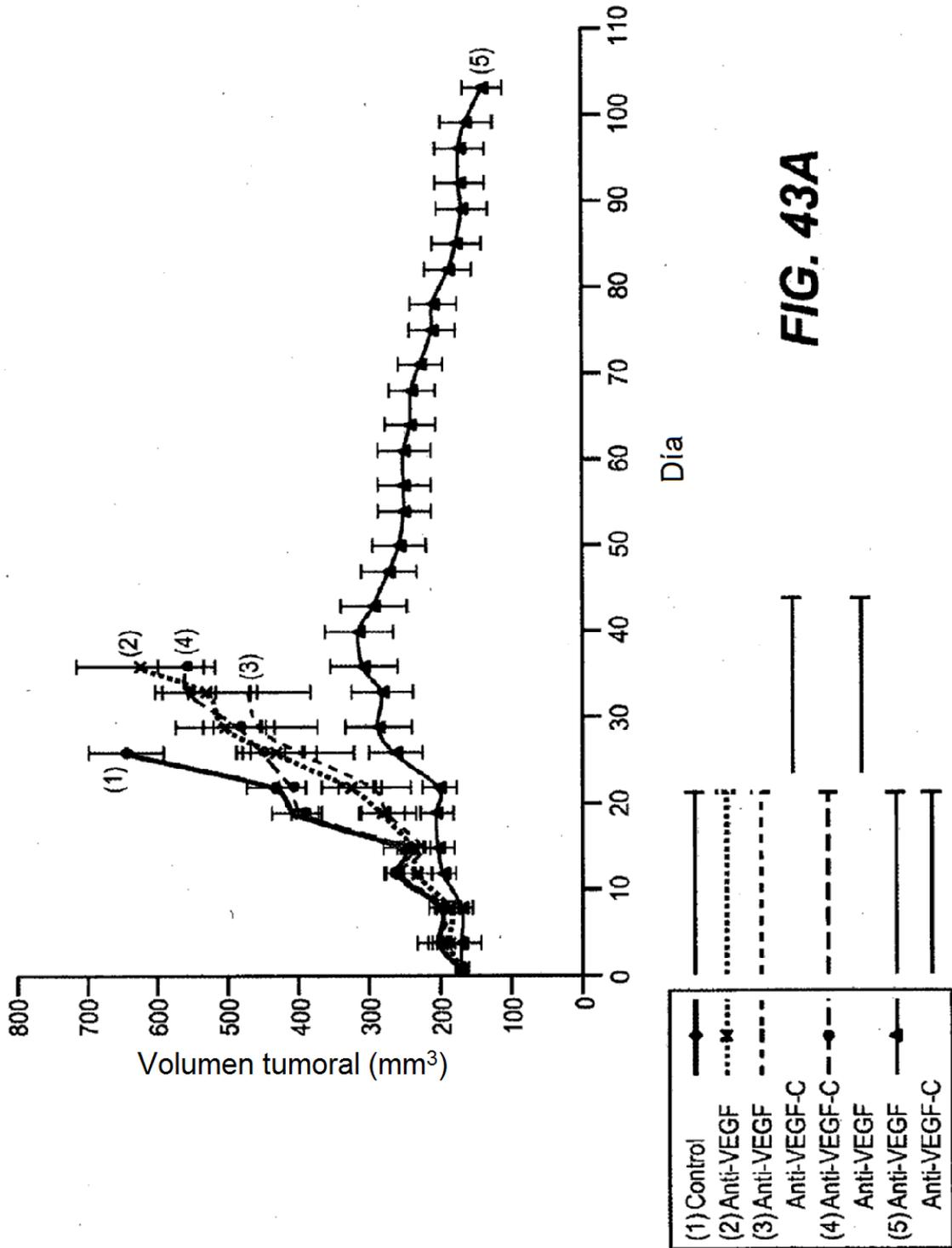
**FIG. 40**

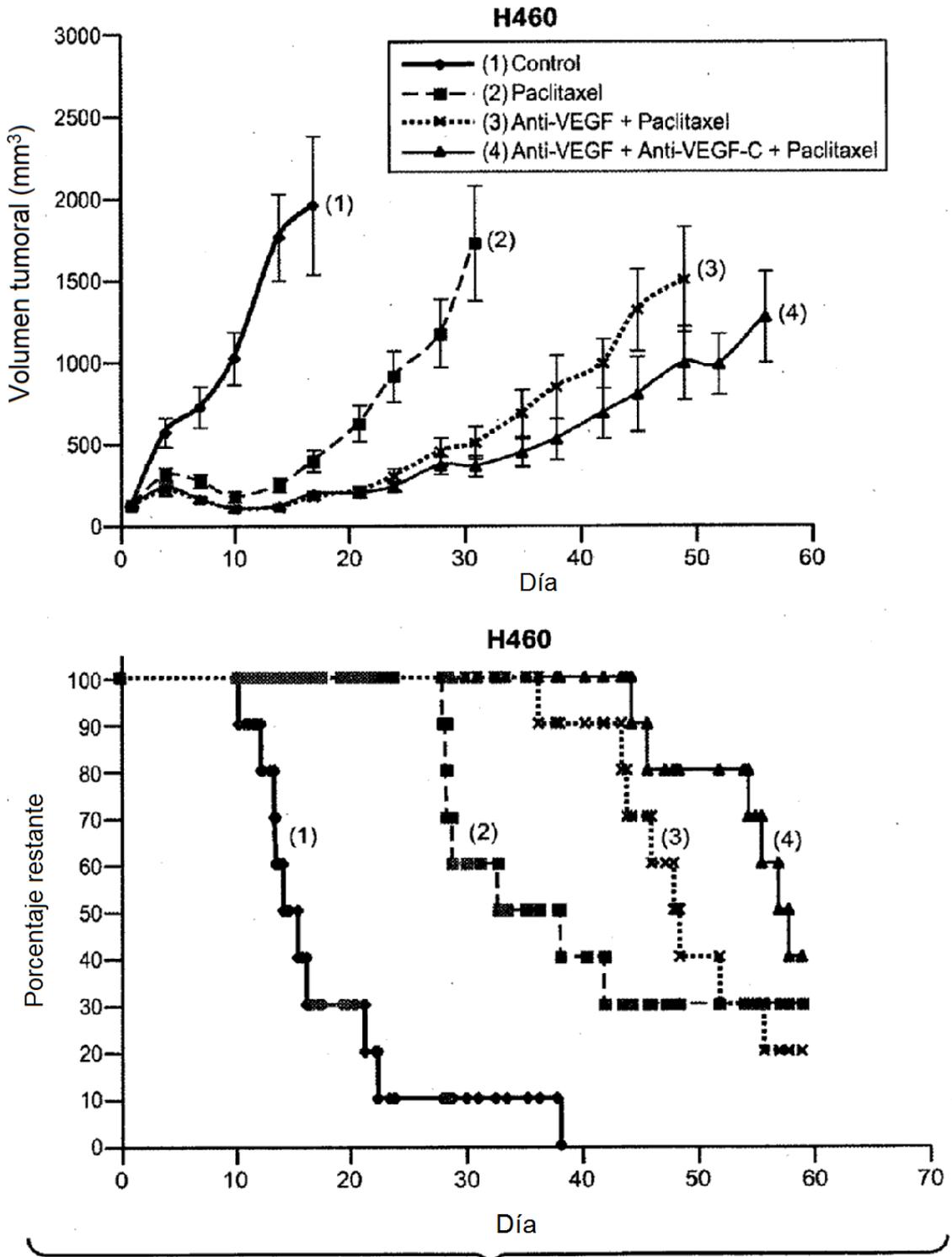


**FIG. 42**



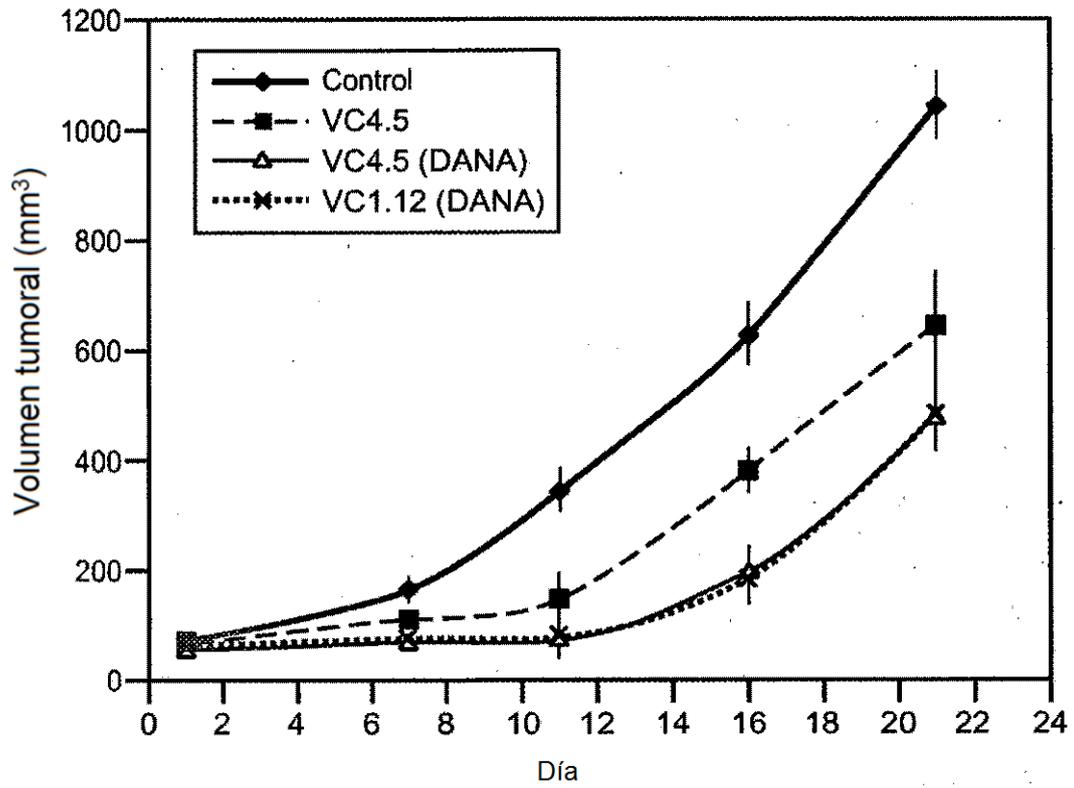
**FIG. 41**



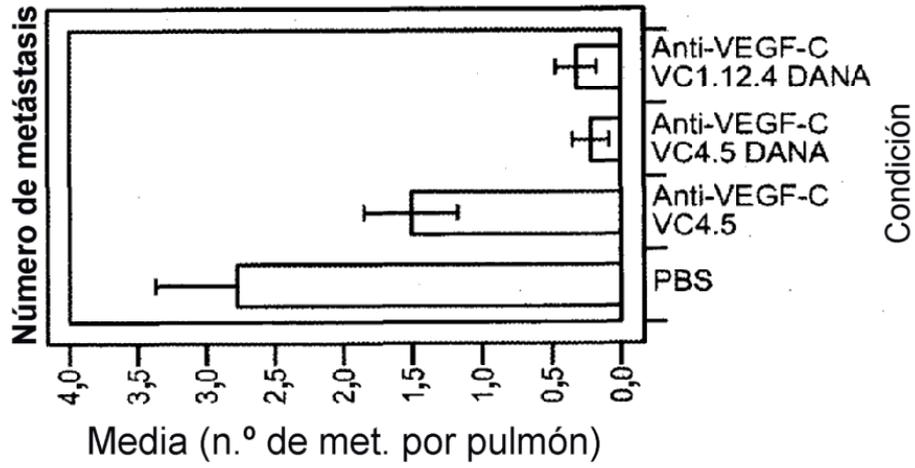


**FIG. 43B**

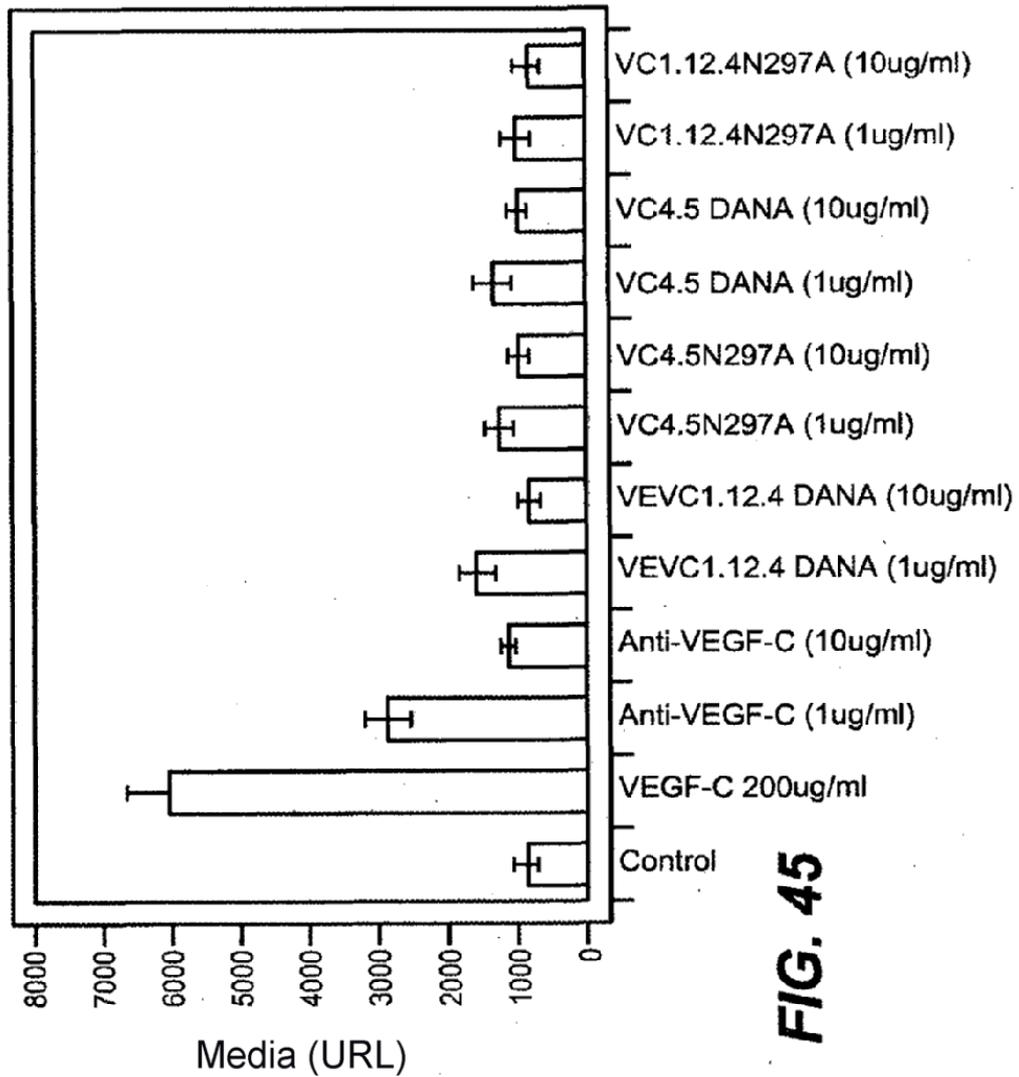
Estudio del tumor 66C14



**FIG. 44**



**FIG. 46**



**FIG. 45**