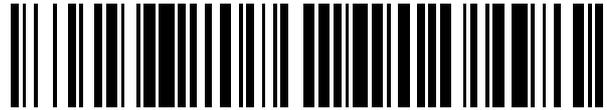


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 481**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2006 E 11160897 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2447281**

54 Título: **Anticuerpo anti-PIGF novedoso**

30 Prioridad:

24.03.2005 US 664768 P

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

05.04.2016

73 Titular/es:

THROMBOGENICS N.V. (33.3%)

Herestraat 49

3000 Leuven, BE;

LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS (33.3%)

y

VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR

BIOTECHNOLOGIE VZW. (33.3%)

72 Inventor/es:

STASSEN, JEAN MARIE;

CARMELIET, PETER y

COLLEN, DÉSIRÉ

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 565 481 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

Anticuerpo anti-PIGF novedoso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos novedosos y fragmentos y derivados de los mismos particularmente adecuados para la inhibición de la angiogénesis en estados patológicos. La invención también se refiere a líneas
 10 celulares que producen los anticuerpos específicos. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos, fragmentos y/o derivados de la invención y proporciona métodos de prevención y tratamiento de la angiogénesis y/o permeabilidad vascular en las que éstas no se desean, tales como en la formación de tumores, enfermedades del ojo, hipertensión pulmonar y trastornos inflamatorios, y métodos de prevención y tratamiento de trastornos óseos, tales como osteoporosis.

Antecedentes de la invención

15 La formación anómala de vasos sanguíneos contribuye a la patogénesis de numerosas enfermedades con alta morbimortalidad. El esclarecimiento de los mecanismos que subyacen al crecimiento vascular podría permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas para estimular el crecimiento vascular en tejidos isquémicos o para suprimir su formación en tumores. Recientes estudios de direccionamiento génico en embriones han identificado algunos de los mecanismos implicados en la formación inicial de canales endoteliales (angiogénesis) y su posterior maduración mediante cobertura con células de músculo liso (arteriogénesis). Surgen pruebas de que mecanismos moleculares distintos pueden mediar el crecimiento de vasos sanguíneos durante estados patológicos, pero los actores moleculares siguen en gran medida sin determinarse.

20 Se ha establecido que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) está implicado en el desarrollo y crecimiento patológico de la vasculatura (Ferrara N. *et al*, 1999, *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 1-30). Además, también se ha mostrado que el factor de crecimiento placentario (PIGF), un homólogo de VEGF, es un modulador específico de VEGF durante una variedad de estados patológicos, tales como retinopatía isquémica, tumorigénesis, trastornos inflamatorios y edema. Se ha mostrado que ratones PIGF^{-/-} tienen una angiogénesis y arteriogénesis alteradas en la enfermedad (Carmeliet P. *et al.*, 2000, *J. Pathol.* 190, 387 - 405), mientras que la angiogénesis fisiológica en salud normal permanece no afectada. Por tanto, los inhibidores de PIGF tienen un gran potencial para el tratamiento de enfermedades en las que la angiogénesis o arteriogénesis contribuyen a la patogenicidad de la enfermedad.

30 Se conocen en la técnica inhibidores para PIGF, tales como un anticuerpo policlonal de cabra contra PIGF humano (R&D pharmaceuticals, Abingdon, RU) y un anticuerpo policlonal de pollo (Gassmann *et al.*, 1990, *Faseb J.* 4, 2528). Esos anticuerpos se usan para estudios de inmunotransferencia de tipo Western, histoquímica e inmunoprecipitación. El documento WO 01/85796 describe el uso de inhibidores de PIGF, incluyendo anticuerpos anti-PIGF monoclonales, para el tratamiento o la prevención de enfermedades, tales como formación de tumores. Más específicamente, se describe la preparación de anticuerpos monoclonales murinos que inhiben completamente la unión de PIGF-2 murino a su receptor Flt-1, mediante lo cual se selecciona el anticuerpo Mab-PL5D11 ya que tiene la actividad inhibidora más eficaz. Se describe el uso del anticuerpo en modelos animales de angiogénesis patológica.

40 Los anticuerpos generados en animales tienen características que pueden limitar gravemente su uso en terapia de seres humanos. Como proteínas foráneas, pueden provocar una respuesta anti-inmunoglobulina (que para los anticuerpos de ratón se denomina anticuerpo anti-ratón humano o HAMA) que reduce o destruye su eficacia terapéutica y/o provoca reacciones alérgicas o de hipersensibilidad en pacientes, tal como enseñan Jaffers *et al.*, 1986 (*Transplantation* 1986 41:572). Aunque el uso de anticuerpos monoclonales humanos abordaría esta limitación, se ha demostrado que es difícil generar grandes cantidades de anticuerpos anti-ser humano humanos mediante la tecnología de hibridoma convencional. Por tanto, se ha usado en la técnica la tecnología recombinante para construir anticuerpos "humanizados" que mantienen la alta afinidad de unión de los anticuerpos animales, tales como anticuerpos monoclonales murinos pero que presentan inmunogenicidad reducida en seres humanos. Particular, se han sugerido anticuerpos quiméricos en los que la región variable (V) de un anticuerpo no humano se combina con la región constante (C) de un anticuerpo humano. Se describen en detalle métodos de obtención de tales inmunoglobulinas quiméricas en la patente de EE.UU. 5.770.198. En otros intentos de reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos, solamente la región determinante de complementariedad (CDR), es decir, regiones de hipervariabilidad en las regiones V, en vez del dominio V completo, se trasplantan a un anticuerpo humano. Tales anticuerpos humanizados se conocen como anticuerpos injertados con CDR. La construcción de anticuerpos injertados con CDR que reconocen antígenos más complejos ha dado como resultado anticuerpos que tienen una actividad de unión significativamente inferior que los anticuerpos no humanizados nativos. En numerosos casos, se demostró que la simple introducción de CDR no humanas en una estructura principal de anticuerpo humano es insuficiente para mantener la actividad de unión completa. Aunque se requiere un modelo informático refinado del anticuerpo murino de interés con el fin de identificar aminoácidos críticos que van a considerarse en el diseño de un anticuerpo humanizado, y se propusieron directrices teóricas generales para tal diseño, en todos los casos el procedimiento debe adaptarse y optimizarse para el anticuerpo no humano particular de interés.

Posteriormente, sigue habiendo una necesidad de anticuerpos (monoclonales) que inhiban óptimamente la unión de PIGF humano a su receptor. Además, también es necesario que tales anticuerpos no sean inmunogénicos, porque no puedan provocar HAMA (o tengan una baja tendencia a hacerlo).

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, que es capaz de unirse a PIGF e inhibirlo y comprende una secuencia de la cadena pesada variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente y una secuencia de la cadena ligera variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, para su uso en un método para reducir los efectos secundarios en una terapia para inhibir la angiogénesis no deseada con un inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF, donde dichos efectos secundarios están causados por dicho inhibidor de VEGF y donde la dosificación de dicho inhibidor de VEGF es menor en comparación con la dosificación en una terapia para inhibir la angiogénesis no deseada con dicho inhibidor de VEGF.

15 La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, que es capaz de unirse a PIGF y comprende una secuencia de la cadena pesada variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente y una secuencia de la cadena ligera variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, para su uso en un método para inhibir la angiogénesis no deseada en una terapia con un inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF, donde la dosificación de dicho inhibidor de VEGF es menor en comparación con la dosificación en una terapia para inhibir la angiogénesis no deseada con dicho inhibidor de VEGF.

25 La presente descripción se refiere a anticuerpos monoclonales y derivados de los mismos dirigidos contra PIGF y capaces de inhibir la unión de PIGF a su receptor. Los presentes ligandos son los primeros en demostrar inhibición de PIGF humano en un estado patológico *in vivo*. Más específicamente, los anticuerpos y derivados de los mismos pueden reducir el tamaño tumoral y la vascularización de tejido tumoral humano *in vivo*. Los anticuerpos proporcionan una alternativa a las terapias antiangiogénicas que seleccionan como diana VEGF usadas actualmente, con la importante ventaja de que los efectos secundarios provocados por la inhibición de la angiogénesis fisiológica asociada con estas terapias se reducen significativamente.

30 La presente descripción se refiere a moléculas de unión a antígeno, particularmente anticuerpos monoclonales, fragmentos o derivados de los mismos, incluyendo anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo, que se unen al mismo epítipo de PIGF que el anticuerpo denominado 16D3 en el presente documento.

35 Un primer objeto es la provisión de anticuerpos monoclonales novedosos que pueden unirse a PIGF y que tienen la capacidad para inhibir el funcionamiento de PIGF, más específicamente anticuerpos que se caracterizan porque su región variable de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos el 80%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente el 95% de identidad de secuencia con la misma dentro de las regiones CDR y/o porque su región variable de cadena ligera comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con la misma dentro de las regiones CDR, tales como el anticuerpo 16D3 o derivados del mismo. Adicional o alternativamente, en una realización adicional, las moléculas de unión a antígeno de la presente invención tienen una identidad de secuencia dentro de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada fuera de las regiones CDR que es al menos del 70%, particularmente al menos el 80%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% idéntica a las secuencias de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

45 Según una realización particular de la descripción, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, más particularmente un anticuerpo híbrido, lo más particularmente un anticuerpo híbrido ratón/ser humano, más particularmente una IgG1k o IgG4k de ratón 16D3/ ser humano híbrida. Alternativamente, el anticuerpo humanizado es uno que comprende las regiones CDR del anticuerpo 16D3 de ratón de la presente invención que puede unirse a PIGF, injertado sobre la estructura principal de un anticuerpo humano.

50 Una realización adicional de la presente descripción se refiere a fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo 16D3 de ratón o un derivado del mismo, tal como un anticuerpo humanizado del mismo, tal como pero no sin limitarse a un Fab, Fab' o F(ab')₂, una combinación de al menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), una región variable de cadena sencilla anclada a la membrana o soluble, o un dominio variable sencillo. Realizaciones particulares de tales fragmentos de unión a antígeno incluyen fragmentos que comprenden al menos dos CDR de 16D3 o derivados del mismo o más particularmente al menos dos CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID NO: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID NO: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID NO: 20 (QSLLSNGMRKSF), SEQ ID NO: 21 (WAS) y SEQ ID NO: 22 (KQSYHLFT), o que comprenden al menos dos secuencias que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con las mismas. Una realización particular de la invención se refiere a la provisión de fragmentos variables de cadena sencilla (scFV) del anticuerpo 16D3 de

ratón y scFv humanizados que pueden inhibir la actividad de PIGF. Lo más particularmente, la presente invención proporciona scFv que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26 o una secuencia que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%. lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con las mismas dentro de las CDR que pueden unirse a PIGF.

5

Aún un objeto adicional de la presente descripción es la provisión de líneas celulares que producen los anticuerpos monoclonales de la presente descripción, más particularmente la línea celular 16D3 que produce el anticuerpo 16D3, pero también otras líneas celulares que pueden producir las moléculas de unión a antígeno derivadas de 16D3 o fragmentos de las mismas, por ejemplo como resultado de tecnología recombinante.

10 Aún un objeto adicional de la presente descripción es la provisión de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la angiogénesis (no deseada) en estados patológicos o trastornos en mamíferos o para la prevención o el tratamiento de resorción ósea, que comprende un anticuerpo contra PIGF que es 16D3 o un fragmento o derivado, más particularmente una versión humanizada de 16D3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Una realización específica de la descripción es una composición farmacéutica que comprende un fragmento de unión a antígeno de 16D3 o un derivado del mismo, que se selecciona del grupo que consiste en un Fab, Fab' o F(ab')₂, una parte variable de cadena sencilla anclada a la membrana o soluble o un dominio variable sencillo. Las realizaciones más particulares de la presente invención se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden un fragmento de unión a antígeno que comprende al menos dos CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID NO: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID NO: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID NO: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID NO: 21 (WAS) y SEQ ID NO: 22 (KQSYHLFT), o al menos dos que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con dos secuencias diferentes seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 a 22. Una realización particular de las mismas se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un scFv del anticuerpo 16D3, más particularmente que comprenden un scFv que comprende al menos dos CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID NO: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID NO: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID NO: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID NO: 21 (WAS) y SEQ ID NO: 22 (KQSYHLFT) o al menos dos secuencias que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con dos secuencias diferentes seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 a 22, tales como un scFv que comprende SEQ ID NO: 24. Lo más particularmente, la composición farmacéutica comprende un scFv humanizado de 16D3, tal como, pero sin limitarse a, el scFv humanizado que comprende SEQ ID NO: 26 o una secuencia que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con la misma dentro de las CDR que pueden unirse a PIGF.

35 Aún en otra realización particular de la composición farmacéutica según la invención, se incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente antiangiogénico además de la molécula de unión a antígeno que puede unirse a PIGF de la invención. Lo más particularmente en este sentido, se prevén agentes antiangiogénicos tales como inhibidores de VEGF y bFGF, lo más particularmente anticuerpos anti-VEGF.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar secuencias de nucleótidos que codifican para los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos que se unen a PIGF descritos en el presente documento, más particularmente secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena ligera y pesada de 16D3 producidas por la línea celular 16D3. Lo más específicamente, se prevé la secuencia de nucleótidos que codifica para las regiones variables de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. Adicionalmente, secuencias de polinucleótidos que codifican para fragmentos de unión a antígeno que comprenden al menos dos CDR de 16D3, más específicamente, polinucleótidos que codifican para al menos dos de las CDR seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID NO: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID NO: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID NO: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID NO: 21 (WAS) y SEQ ID NO: 22 (KQSYHLFT), o que codifican para secuencias que comprenden al menos dos CDR que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17 a 22. Se proporcionan realizaciones específicas de las secuencias de nucleótidos en SEQ ID No 1, 3, 5 y 6. Realizaciones específicas adicionales incluyen las secuencias de nucleótidos que codifican para el scFv de 16D3 y versiones humanizadas del mismo, lo más particularmente la secuencia de SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25 y secuencias que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos 90%, lo más particularmente al menos el 25% de identidad de secuencia con las mismas, más particularmente dentro de las regiones que codifican las regiones CDR de scFv. Sin embargo, se comprenderá que existen multitud de secuencias de nucleótidos como resultado de la redundancia en el código genético.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método de tratamiento y/o prevención de la angiogénesis no deseada (o patológica) en un estado patológico en un mamífero, método que comprende administrar a un mamífero que necesita tal tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio activo que es el anticuerpo 16D3 o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo, lo más particularmente un scFv tal como se describe en el presente documento. Los anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo son particularmente adecuados para los métodos de la presente descripción, tales como scFv de 16D3 o derivados del

60

mismo. Una realización particular del método de la invención se refiere al tratamiento y/o la prevención de estados patológicos tales como, pero sin limitarse a cáncer, inflamación, enfermedades del ojo, hipertensión pulmonar y permeabilidad vascular. Un objetivo particular de la presente invención es proporcionar una terapia eficaz y segura (es decir, sin efectos secundarios) para angiogénesis patológica, más en particular para crecimiento tumoral, inflamación, enfermedades del ojo o permeabilidad vascular, en mamíferos, más particularmente en seres humanos. Lo más particularmente, el método de la presente invención es adecuado para el tratamiento y/o la prevención de tumores sólidos, más particularmente para el tratamiento y/o la prevención de cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático y melanomas.

Usos adicionales de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno se refieren a la detección inmunológica de PIGF en muestras humanas, como restos de direccionamiento marcados en métodos de diagnóstico y para la selección de compuestos con un efecto aditivo a la inhibición PIGF en el tratamiento de cáncer.

La presente descripción se basa en la sorprendente determinación de nuevos ligandos, concretamente nuevos anticuerpos monoclonales humanizados y murinos y fragmentos, derivados y homólogos de los mismos que inhiben PIGF muy eficazmente. Lo más particularmente, la presente descripción demuestra ligandos que pueden reducir el crecimiento tumoral, lo más particularmente que pueden reducir el tamaño de un tumor entre el 20% y el 50%.

Breve descripción de las figuras

La siguiente descripción, que no pretende limitar la invención a realizaciones específicas descritas en la misma, puede entenderse conjuntamente con las figuras que se acompañan, incorporadas a la presente por referencia, en las que:

Figura 1: Unión del anticuerpo 16D3 (A) o el anticuerpo humanizado 16D3 (hu16D3)(B) a PIGF-2 humano (producido en *Pichia*) con una prueba de ELISA según una realización de la presente invención.

Figura 2: Inhibición de la unión de PIGF-2 al receptor Flt-1 humano por el anticuerpo 16D3 (cuadrados) o el anticuerpo humanizado 16D3 (triángulos) con una prueba de ELISA según una realización de la presente invención.

Figura 3: Resultados de los experimentos Biacore en los que se inmoviliza rhuPIGF-2 en un chip CM5 con el fin de investigar el potencial de inhibición del anticuerpo 16D3 y su prueba de fragmento Fab según una realización de la presente invención.

Figura 4: El anticuerpo monoclonal 16D3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto DanG pancreático humano subcutáneo. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con anti-tPA ('IgG control') (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), 16D3 anti-hPIGF ('anti-hPIGF') (50 mg/kg de peso corporal; n=10), anti-mPIGF (PL5D11D4 (obtenido tal como se describe en el documento WO 01/85796; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), una combinación de 16D3 anti-hPIGF y un PL5D11D4 anti-mPIGF ('anti-hPIGF/anti-mPIGF') (cada uno 25 mg/kg de peso corporal; n=10) y 'vehículo' (n=10) según una realización de la presente invención. (A) Tamaño tumoral (B) peso tumoral 18 días tras la inoculación del tumor.

Figura 5: El anticuerpo monoclonal 16D3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto DanG pancreático humano subcutáneo de una manera dependiente de la dosis. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg = '1000 µg'/'C', 37,5 mg/kg = '750 µg'/'D', 25 mg/kg = '500 µg'/'E', 12,5 mg/kg = '250 µg'/'F'; n=10 para cada concentración), IgG control ('1C8'/'B'; 50 mg/kg) y 'vehículo'/'A' (n=10) según una realización de la presente invención. A: evolución del tamaño tumoral medio tras la inoculación de células tumorales; B: tamaño tumoral medio promedio en el día 20.

Figura 6: El anticuerpo monoclonal 16D3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto MDA-MB de mama humano subcutáneo. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) o vehículo tres veces a la semana según una realización de la presente invención. A: peso tumoral y B: volumen tumoral tal como se determina 32 días tras la inoculación.

Figura 7: El anticuerpo monoclonal 16D3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto LOVO de colon humano subcutáneo. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) o vehículo tres veces a la semana según una realización de la presente invención. A: peso tumoral y B: volumen tumoral tal como se determina 30 días tras la inoculación.

Figura 8: El anticuerpo monoclonal 16D3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto Mel2a de melanoma humano subcutáneo. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) o vehículo tres veces a la semana según una realización de la presente invención. Peso tumoral tal como se determina 53 días tras la inoculación.

Figura 9: El anticuerpo monoclonal 16D3 previene la pérdida de peso corporal en un modelo de tumor de xenoinjerto DanG pancreático humano subcutáneo. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG control, una combinación de anti-hPIGF y anti-mPIGF (cada uno 25 mg/kg de peso corporal; n=10) y vehículo (n=10) según una realización de la presente invención. Se

restó el peso tumoral del peso corporal antes de calcular el porcentaje de pérdida de peso corporal. Barras blancas: peso corporal en el primer día de tratamiento; barras negras: peso corporal en el último día de tratamiento.

Figura 10: El anticuerpo monoclonal 16D3 y Avastin ejercen un efecto adicional sobre la inhibición del crecimiento tumoral en un DanG pancreático humano subcutáneo. Tratamiento de ratones nu/nu con tumores de aproximadamente 60 mm³ con 16D3 anti-hPIGF (37,5 mg/kg, 25 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal; n=10 para cada concentración), IgG control (1C8; 50 mg/kg), Avastin (15 mg/kg y 5 mg/kg de peso corporal, i.p. dos veces a la semana, n=10 cada uno) y una combinación de anti-hPIGF (12,5 mg/kg de peso corporal) y Avastin (5 mg/kg de peso corporal; n=10) según una realización de la presente invención. Se sacrificaron los ratones 20 días después de la inoculación del tumor y se determinó el volumen tumoral.

Figura 11: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de partes variables del anticuerpo murino 16D3 según una realización de la presente invención. A. Secuencia de nucleótidos que codifica para la parte variable de la cadena pesada; B. Secuencia de nucleótidos que codifica para la parte variable de la cadena ligera; C. Secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena pesada; D. Secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena ligera. Los nucleótidos o aminoácidos que pueden modificarse para fines de humanización según una realización de la invención están subrayados.

Figura 12: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de partes variables humanizadas de 16D3 según una realización de la presente invención. A. Secuencia de nucleótidos que codifica para la parte variable humanizada de la cadena pesada; B. Secuencia de nucleótidos que codifica para la parte variable humanizada de la cadena ligera; C. Secuencia de aminoácidos de la parte variable humanizada de la cadena pesada; D. Secuencia de aminoácidos de la parte variable humanizada de la cadena ligera. Los nucleótidos o aminoácidos modificados para fines de humanización están subrayados.

Figura 13: Ilustración del vector para la expresión de scFv de 16D3 humanizado en células 293.

Figura 14: A: Unión de scFv16D3 y scFv16D3 humanizado a PIGF; B: Inhibición de la unión de huPIGF-2 a su receptor huFlt-1 mediante scFv16D3 y scFv16D3 humanizado (B).

Figura 15: A: Secuencia de aminoácidos de scFv del anticuerpo murino 16D3; B: Secuencia de aminoácidos de scFv humanizado del anticuerpo 16D3. Las regiones fuera de las regiones variables de cadena ligera y pesada están subrayadas.

Figura 16: Ilustración del vector para la expresión de Fab de 16D3 humanizado en células 293 según una realización de la invención.

Figura 17: A: Unión de Fab 16D3 humanizado a huPIGF con una prueba de ELISA según una realización de la presente invención; B: Inhibición de la unión de huPIGF-2 a su receptor huFlt-1 mediante Fab16D3 humanizado.

Definiciones

El término '16D3' tal como se usa en el presente documento se refiere al anticuerpo monoclonal contra PIGF producido por la línea celular depositada en la BCCM/LMBP con el número LMBP 6399CB.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una subparte de una molécula de anticuerpo que sola, o en combinación con otros fragmentos, puede unirse al antígeno contra el que se generó el anticuerpo correspondiente. Fragmentos de anticuerpo típicos son Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv, que a menudo conservan una afinidad por el antígeno que es comparable al anticuerpo completo. Los fragmentos más pequeños incluyen regiones determinantes de complementariedad o CDR tales como CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada o ligera y/o combinaciones de dos o más de los mismos.

El término "derivado" se usa en el presente documento para referirse a una molécula de unión a antígeno que corresponde a una modificación del anticuerpo original (por ejemplo tal como se produce por una línea celular de hibridoma) o fragmento del mismo, sin afectar significativamente a la unión al antígeno. Las modificaciones típicas incluyen modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original o modificaciones de los grupos funcionales presentes en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo en el contexto de humanización, para la unión del anticuerpo o fragmento del mismo a otras moléculas tales como marcadores o perlas, o para la modificación de glicosilación. Por tanto, los derivados incluyen pero no se limitan a anticuerpos humanizados, anticuerpos híbridos, anticuerpos u otras moléculas de unión a antígeno que se han obtenido mediante injerto o introduciendo una o más de las regiones variables y/o CDR del anticuerpo original en la estructura principal de otro anticuerpo o fragmento del mismo o una especie diferente. Los derivados de un anticuerpo incluyen estructuras alternativas de una o más CDR del anticuerpo que dan como resultado una molécula de unión a antígeno tal como un polipéptido sintético.

Un "anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de anticuerpo o fragmento del mismo en el que, en comparación con el anticuerpo original, se han sustituido aminoácidos con el fin de parecerse más estrechamente a un anticuerpo humano. La mayoría de estas sustituciones estarán en la estructura principal del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, es decir, en regiones que

no se unen al antígeno. Sin embargo, se prevé que dentro de las CDR aminoácidos que no forman parte o apenas lo hacen en la unión al antígeno también puedan sustituirse.

Un anticuerpo "reconformado" o fragmento de anticuerpo o un "anticuerpo híbrido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que comprende partes de al menos dos anticuerpos diferentes, que pueden ser opcionalmente de la misma o de una especie diferente. Normalmente, un anticuerpo híbrido humano puede ser una región constante humana de un anticuerpo unida a una región variable humanizada de otro anticuerpo (que se dirige contra el antígeno de interés) o una estructura principal de anticuerpo humano de un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos en las regiones de unión a antígeno se han reemplazado con secuencias de otro anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo no humano dirigido contra un antígeno humano de interés. Más particularmente, las regiones de unión a antígeno de un anticuerpo (habitualmente no humano) que tiene una afinidad por un antígeno de interés, tal como una o más CDR o regiones variables o partes del mismo, se introducen en la estructura principal de otro anticuerpo (habitualmente humano) (por ejemplo anticuerpos injertados con CDR).

El término "homología" u "homólogo" tal como se usa en el presente documento con referencia a dos o más moléculas de unión a antígeno de la presente invención se refiere a la capacidad de las moléculas de unión a antígeno para unirse al mismo antígeno, más particularmente al mismo epítipo. Puede evaluarse la capacidad de dos moléculas de unión a antígeno para unirse al mismo epítipo mediante la determinación de si las moléculas de unión a antígeno pueden competir entre sí por la unión al mismo antígeno, por ejemplo en un ensayo de unión competitiva. La unión al antígeno de moléculas de unión a antígeno homólogas debe ser de especificidad similar.

La "identidad de secuencia" de dos secuencias tal como se usa en el presente documento se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, cuando se alinean las dos secuencias. Preferiblemente, dicha identidad de secuencia es superior al 70%-80%, preferiblemente al 81-85%, más preferiblemente al 86-90%, de manera especialmente preferible al 91-95%, lo más preferiblemente al 96-100%, más específicamente es del 100%. En vista de la contribución generalmente limitada de la estructura principal de las regiones variables a la unión con el antígeno, la identidad de secuencia se especifica lo más comúnmente en el presente documento con respecto a la secuencia dentro de las regiones determinantes de complementariedad o CDR, es decir, con respecto a las secuencias de nucleótidos que codifican para y las secuencias de aminoácidos que constituyen las CDR. Por tanto, cuando se especifica que una secuencia tiene por ejemplo un 80% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia específica 'dentro de las CDR', se pretende proporcionar la identidad de secuencia entre las dos secuencias sólo con respecto a las secuencias que constituyen las CDR.

El término "PIGF" se usa en el presente documento para referirse al factor de crecimiento placentario. Se ha encontrado que PIGF se produce principalmente en dos variantes de corte y empalme o isoformas, PIGF-1 de 149 aminoácidos y PIGF-2 de 170 aminoácidos, que comprende una inserción de 21 aminoácidos en la región carboxilo-terminal, pero también se han encontrado otras isoformas.

El término 'inhibitorio' cuando se refiere a un anticuerpo frente a PIGF o fragmento o derivado del mismo se usa para indicar que el anticuerpo, fragmento o derivado puede inhibir la unión de PIGF a su receptor Flt-1.

Descripción detallada

La presente invención se describirá con referencia a determinadas realizaciones y a determinadas figuras, aunque la presente invención no está limitada por ellas, sino sólo por las reivindicaciones.

La presente descripción se refiere a moléculas de unión a antígeno, particularmente anticuerpos monoclonales, fragmentos o derivados de los mismos, que se unen al mismo epítipo de PIGF que el anticuerpo denominado 16D3 en el presente documento anticuerpo. El "anticuerpo 16D3", producido mediante la línea celular LMBP 6399CB, se generó contra PIGF de origen humano, y se une a PIGF humano (ambas isoformas PIGF-1 y PIGF-2). El anticuerpo 16D3 inhibe la unión de PIGF humano a su receptor flt-1, inhibiendo la actividad de PIGF. El propio anticuerpo 16D3 y fragmentos o derivados del mismo, así como secuencias de nucleótidos que codifican para el anticuerpo, fragmentos o derivados, pueden usarse por tanto para la inhibición de PIGF tanto en un contexto terapéutico como en un modelo animal para fines de pruebas o selección. Alternativamente, el anticuerpo puede usarse para la detección y/o cuantificación de PIGF o bien *in vivo*, *ex vivo*, o bien *in vitro*. Por tanto, la presente descripción proporciona aplicaciones diferentes de las moléculas de unión a antígeno de la descripción y las secuencias de nucleótidos que codifican para las mismas. La descripción también se refiere a métodos de producción de las moléculas de unión a antígeno de la descripción, y a líneas celulares que pueden producir estas moléculas de unión a antígeno.

Un primer aspecto de la presente descripción se refiere a líneas celulares que producen las moléculas de unión a antígeno de la invención, más particularmente líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales que pueden unirse al mismo antígeno que 16D3 o fragmentos o derivados del mismo. Una realización particular de este aspecto de la descripción es la línea celular de hibridoma también denominada 'línea celular 16D3' que produce el anticuerpo monoclonal 16D3 y que se depositó en la BCCM/LMBP (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection Laboratorium voor Moleculaire Biologie, Universidad de Gante K.L.

Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, BE por Thromb-X el 29 de marzo del 2005 como el número de depósito LMBP 6399CB. La presente descripción proporciona además líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales derivados del anticuerpo monoclonal 16D3. Tales líneas celulares pueden obtenerse mediante la modificación de la secuencia codificante para el anticuerpo monoclonal 16D3, lo más particularmente la secuencia codificante que
 5 codifica para las regiones que no se unen a antígeno de 16D3. Se describen en el presente documento métodos de determinación de la naturaleza de las modificaciones que van a hacerse, y ejemplos de modificaciones adecuadas.

Un segundo aspecto de la descripción se refiere a moléculas de unión a antígeno que pueden unirse al mismo antígeno que el anticuerpo 16D3. Más particularmente, la descripción se refiere al anticuerpo denominado 16D3 producido por la línea celular 16D3 descrita anteriormente y homólogos, fragmentos y derivados de los mismos que
 10 pueden unirse a PIGF e inhibir la actividad de PIGF.

Por tanto, una realización particular de la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal anti-PIGF humano, el anticuerpo 16D3, tal como se produce mediante línea celular LMBP 6399CB, y fragmentos de este anticuerpo. El anticuerpo monoclonal 16D3 se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de sus cadenas pesada y ligera tal como se da a conocer en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

Según una realización específica, la presente descripción se refiere a fragmentos, más particularmente fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo 16D3. Tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(ab')₂, CDR's, péptidos con una secuencia de una parte del anticuerpo o sus CDR, dominios variables sencillos y combinaciones de los mismos. Los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden generarse mediante digestión proteolítica de anticuerpos monoclonales usando métodos bien conocidos en la técnica, tal como se describe por Stanworth *et al.*, Handbook of
 15 Experimental Immunology (1978), vol. 1 capítulo 8 (Blackwell Scientific Publications). Tales fragmentos, que conservan la capacidad de unirse al antígeno, han perdido varias propiedades del anticuerpo original, tales como la activación del complemento o la capacidad para unirse a receptores de Fc gamma. Más específicamente, la presente invención proporciona fragmentos que comprenden las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de 16D3 que corresponden a SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 respectivamente. Una realización particular adicional se refiere a fragmentos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de 16D3 y derivados del mismo. Los dos métodos más comúnmente seguidos para identificar CDR son IMGT y KARAT, y se prevén fragmentos que comprenden más de uno de cualquier tipo de CDR de 16D3 dentro del contexto de la invención, así como derivados de 16D3 que comprenden estos fragmentos o CDR. Según la identificación IMGT de CDR, las regiones CDR dentro de las regiones variables de 16D3 corresponden a SEQ ID NO: 17 (GYTFTDYY),
 20 SEQ ID NO: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID NO: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID NO: 20 (QSLNLSGMRKSF), SEQ ID NO: 21 (WAS) y SEQ ID NO: 22 (KQSYHLFT). Por tanto, la presente descripción proporciona fragmentos del anticuerpo 16D3 que comprenden una o más de las CDR de 16D3 tal como se proporciona en SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 22.

Una realización específica adicional de la descripción proporciona fragmentos de 16D3 que son partes variables de cadena sencilla ancladas a la membrana o solubles de 16D3. Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) es un fragmento de anticuerpo modificado por ingeniería genética que habitualmente consiste en la cadena pesada (VH) y cadena ligera (VL) variables de una inmunoglobulina, o partes de la misma, unidas entre sí mediante un ligador peptídico flexible. Opcionalmente, los scFv comprenden las regiones CDR del anticuerpo de interés y regiones de entramado de otro anticuerpo. La secuencia de aminoácidos de la región de entramado de scFv y/o regiones CDR se humaniza opcionalmente para reducir la antigenicidad para su uso como producto farmacéutico en seres humanos. La descripción proporciona un scFv de 16D3 y una versión humanizada del mismo que comprende SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 26, respectivamente. El experto en la técnica conoce métodos para obtener partes variables de cadena sencilla de anticuerpos y se describen en el ejemplo 6 en el presente documento. Por ejemplo, el método puede incluir la amplificación de las secuencias de ADN de las partes variables de las cadenas pesada y ligera humanas en reacciones separadas y la clonación, seguido por la inserción de una secuencia ligadora de quince aminoácidos, por ejemplo (Gly4 Ser)₃ entre VH y VL mediante una reacción en cadena de polimerasa de dos etapas (PCR) (véase por ejemplo Dieffenbach y Dveksler, "PCR Primer, a laboratory manual" (1995), Cold Spring Harbour Press, Plainview, NY, EE.UU.). El fragmento resultante puede insertarse entonces dentro de un vector adecuado para la expresión del fragmento variable de cadena sencilla como polipéptido soluble o presentado en fago. Esto puede lograrse mediante métodos bien conocidos para los expertos en la técnica, tal como se describe por Gilliland *et al.*, Tissue Antigens (1996) 47:1-20.
 35
 40
 45
 50

La presente descripción también proporciona fragmentos de 16D3 que son péptidos de unión a antígeno representativos de las regiones hipervariables del anticuerpo 16D3 o combinaciones de los mismos. Tales péptidos se pueden obtener por síntesis utilizando un sintetizador de Applied Biosystem, por ejemplo, un sintetizador de polipéptidos tal como el modelo 9050 que se puede adquirir de Milligen (EE. UU.) o un modelo de una tecnología relacionada.
 55

Una realización adicional de la descripción se refiere a derivados del anticuerpo 16D3 o fragmentos del mismo. Más particularmente, la descripción se refiere a anticuerpos se comprenden una región de la cadena pesada variable y o una región de la cadena ligera variable tal como se describe en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, pero cuyas regiones constantes son diferentes de las de 16D3. Adicionalmente, o como alternativa, los derivados del anticuerpo 16D3 de la presente invención comprenden al menos dos de las CDR de 16D3 tal como se proporcionan
 60

en SEQ ID NO: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID NO: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID NO: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID NO: 20 (QSLNLSGMRKSF), SEQ ID NO: 21 (WAS) y SEQ ID NO: 22 (KQSYHLFT), mientras que las regiones de entramado entre las CDR y/o las regiones constantes son diferentes.

5 Según una realización, se proporcionan derivados del anticuerpo 16D3 o fragmentos del mismo que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con la región variable de la cadena pesada y ligera de 16D3 que se proporcionan en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO:4 respectivamente. Lo más particularmente, la presente invención proporciona derivados del anticuerpo 16D3 o derivados del mismo que comprenden una región variable de la cadena pesada y/o una región de la cadena ligera que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente dentro de las regiones CDR. La identidad de secuencia dentro de las regiones de entramado puede ser, pero sin limitarse a, menos del 80%. También se contemplan derivados que comprenden al menos dos CDR que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con las secuencias de SEQ ID NO: 17 a 22, respectivamente.

20 Según una realización adicional, la descripción proporciona un derivado de un scFv de 16D3 que comprende una secuencia que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24 y una secuencia que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 26, lo más particularmente dentro de las regiones CDR.

25 Según otra realización, la descripción proporciona derivados de 16D3 o fragmentos del mismo que están humanizados. Tales derivados humanizados de 16D3 son homólogos porque conservan su afinidad de unión por PIGF. Según una realización particular, los derivados humanizados de 16D3 también conservan la capacidad para inhibir la actividad de PIGF. La humanización de anticuerpos no humanos se logra mediante un reemplazamiento de uno o más aminoácidos en la estructura principal del anticuerpo, es decir, aquellos aminoácidos no implicados en la unión del anticuerpo al antígeno, de manera que se parezcan más estrechamente a la estructura principal de un anticuerpo humano. Se prevén diferentes tipos o niveles de humanización. Realizaciones particulares se refieren a anticuerpos o fragmentos en que las regiones enteras, más particularmente la(s) región/regiones constante(s) del anticuerpo no humano o fragmento se reemplaza(n) por la(s) región/regiones constante(s) de un anticuerpo humano, de manera que da como resultado fragmentos o anticuerpos quiméricos (por ejemplo de humano/murinos). Realizaciones particulares adicionales son anticuerpos en los que los aminoácidos que se unen al antígeno (por ejemplo dos o más CDR) del anticuerpo no humano contra PIGF se introducen en la estructura principal de un anticuerpo humano (por ejemplo anticuerpos injertados con CDR). El experto conoce métodos para asociar la región determinante de complementariedad de unión ("CDR") del anticuerpo monoclonal no humano con regiones de entramado humanas (en particular, la región C constante de un gen humano), tal como se da a conocer por Jones *et al.* en *Nature* (1986) 321:522 o Riechmann en *Nature* (1988) 332:323. También se prevé alternativamente un reemplazamiento de un número más limitado de aminoácidos de los anticuerpos anti-PIGF no humanos de la invención. Realizaciones particulares se refieren a anticuerpos que comprenden regiones de cadena ligera y/o pesada variables humanizadas de la figura 9 o partes de los mismos y anticuerpos que comprenden al menos dos, más particularmente de tres a cinco, lo más particularmente las seis CDR de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 22. Realizaciones adicionales se refieren a anticuerpos humanizados que comprenden regiones de cadena ligera y/o pesada variables que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, respectivamente. Alternativamente, la presente invención proporciona anticuerpos humanizados que comprenden al menos dos, más particularmente de tres a cinco, lo más particularmente seis CDR que tienen al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17 a 22, respectivamente.

50 La presente descripción se refiere por tanto a anticuerpos híbridos humanizados y/o quiméricos derivados del anticuerpo murino 16D3. En una realización particular, los aminoácidos específicos del anticuerpo murino 16D3 se mutan con el fin de eliminar aminoácidos inmunogénicos. Por tanto, en una realización particular, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena pesada según SEQ ID NO: 2 en la que uno o más de los siguientes aminoácidos se ha cambiado: I2V, P9A, K40A y/o T111L. Adicional o alternativamente, los anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo 16D3 son moléculas de unión a antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena ligera según SEQ ID NO: 4, en la que uno o más de los siguientes aminoácidos se ha cambiado: S5T, S9D, A15L, K18R, R22N y/o L89V. Por tanto, según una realización particular, la invención proporciona moléculas de unión a antígeno que comprenden tanto una secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena pesada según SEQ ID NO: 2, en la que uno o más de los siguientes aminoácidos se ha cambiado: I2V, P9A, K40A y/o T111L como una secuencia de aminoácidos de la parte variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4 en la que uno o más de los siguientes aminoácidos se ha cambiado: S5T, S9D, A15L, K18R, R22N y/o L89V.

60 En otra realización, el anticuerpo se humaniza adicionalmente porque las cadenas ligera y/o pesada variables

(humanizadas) del anticuerpo murino 16D3 se injertan en un marco de inmunoglobulina humana o se acoplan a la región constante de un anticuerpo humano, más en particular a una región constante de IgG humana. Particularmente adecuadas en este sentido son IgG1k (IgG1-kappa), que pueden activar células citotóxicas naturales en el cuerpo. En una realización particular, la presente invención se refiere por tanto a un híbrido Hu16D3 - IgG1k. Una realización alternativa de la presente invención es un híbrido Hu16D3 - IgG4k. Los anticuerpos de IgG humanos (y por tanto también anticuerpos híbridos obtenidos usando una estructura principal de IgG humana y/o regiones constantes) presentan un tiempo de vida media prolongado, proporcionando por tanto niveles plasmáticos muy estables y permitiendo una reducción drástica en la frecuencia de administración. Además, el uso de anticuerpos o derivados humanizados conlleva a un riesgo mínimo de inducción de respuestas inmunitarias.

Realizaciones adicionales se refieren a moléculas de unión a antígeno que son homólogas al anticuerpo 16D3 o fragmentos del mismo, es decir, moléculas de unión a antígeno que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 16D3. En una realización, se producen las moléculas de unión a antígeno homólogas con el fin de realizar una inmunización en animales, más particularmente ratones, por ejemplo inyectando PIGF en ratones y a continuación fusionando los linfocitos del bazo con una línea celular de mieloma de ratón, identificando a continuación los cultivos celulares que producen anticuerpos anti-PIGF (p. ej., seleccionando según la unión a PIGF) y clonándolos. Opcionalmente, se realiza una selección adicional de los anticuerpos en función de la reactividad con el epítipo 16D3 o la competencia con el anticuerpo 16D3 o un fragmento del mismo.

De este modo, aún otro aspecto se refiere a métodos para producir las moléculas de unión a antígeno de la presente descripción. Estos métodos incluyen, pero sin limitarse a, los métodos de humanización del anticuerpo 16D3 tal como se proporcionan en la sección de Ejemplos del presente documento.

Aún otro aspecto se refiere a la provisión de secuencias de nucleótidos que codifican para las moléculas de unión a antígeno de la presente descripción, lo más particularmente las regiones de unión a antígeno de las mismas. Realizaciones particulares se refieren a las secuencias de nucleótidos que codifican para la región de cadena pesada variable y la región variable de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, tal como, pero sin limitarse a las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, que corresponden a las secuencias de la línea celular 16D3 que codifican para la región de cadena pesada y ligera del anticuerpo 16D3. También se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican para una o más de las regiones CDR del anticuerpo monoclonal 16D3 tal como se identifica en SEQ ID NO: 17 a 22. Realizaciones particulares de la invención incluyen la secuencia que codifica scFv y scFv humanizados de 16D3 tal como, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25, respectivamente. La descripción también proporciona secuencias de nucleótidos que codifican los derivados de 16D3 y fragmentos del mismo, tal como se describe en la presente. La presente invención también proporciona sondas y cebadores capaces de hibridarse específicamente con las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente, tal como, pero sin limitarse a, los cebadores descritos en la sección de Ejemplos.

La presente invención también incluye secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias que codifican para los anticuerpos monoclonales, fragmentos o derivados de los mismos, descritos en el presente documento.

La presente descripción proporciona por tanto el uso de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención como medicamento. En este sentido, se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden una o más de las moléculas de unión a antígeno de la invención, para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que la angiogénesis contribuye a la patología de la enfermedad o el trastorno. Por consiguiente, métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades en los que la angiogénesis contribuye a la patología de la enfermedad o el trastorno que comprenden administrar a un mamífero que necesita de dicho tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una o más de las moléculas de unión a antígeno descritas en el presente documento.

En tales enfermedades, la angiogénesis también se denomina 'angiogénesis patológica'. Los ejemplos de tal angiogénesis patológica incluyen la angiogénesis observada en la patología de vasos sanguíneos (aterosclerosis, hemangioma, hemangioendotelioma), de huesos y articulaciones (artritis reumatoide, sinovitis, destrucción de hueso y cartílago, osteomielitis, crecimiento del paño, formación de osteofitos, neoplasias y metástasis), de la piel (verrugas, granulomas piógenos, crecimiento de cabello, sarcoma de Kaposi, queloides de cicatrices, edema alérgico, neoplasias), del hígado, riñón, pulmón, oído y otros epitelios (procesos inflamatorios e infecciosos incluyendo hepatitis, glomerulonefritis, neumonía, asma, pólipos nasales, otitis y trasplante, regeneración, neoplasias y metástasis en estos órganos), en determinadas patologías del útero, ovario y placenta (hemorragia uterina disfuncional debida por ejemplo a dispositivos anticonceptivos intrauterinos, formación de quistes foliculares, síndrome de hiperestimulación ovárica, endometriosis, neoplasias), patologías en el cerebro o nervios (neoplasias y metástasis), determinadas afecciones del músculo esquelético y el corazón (por ejemplo debido a sobrecarga de trabajo), estados patológicos del tejido adiposo (obesidad) y órganos endocrinos (tiroiditis, agrandamiento del tiroides, trasplante de páncreas). La angiogénesis patológica también puede contribuir a enfermedades de la hematopoyesis (SIDA, Kaposi), tumores malignos hematológicos (leucemias, etc.).

En una serie de enfermedades del ojo, se cree que la angiogénesis patológica es un factor importante, y por tanto se prevé el tratamiento con las moléculas de unión a antígeno de la presente invención. En las 'enfermedades

isquémicas retinianas' el suministro de sangre y oxígeno de la retina disminuye, las partes periféricas de la retina pierden su fuente de nutrición y dejan de funcionar apropiadamente. Las causas comunes de la retinopatía son oclusión de la vena central de la retina, estenosis de la arteria carótida, diabetes (retinopatía diabética) y anemia (retinopatía de células falciformes). La retinopatía también se observa en lactantes prematuros (retinopatía de la prematuridad). La retinopatía diabética es una causa importante de pérdida visual en pacientes diabéticos. En la retina isquémica, se produce el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Estos vasos crecen con frecuencia en la superficie de la retina, en el nervio óptico o en frente del ojo en el iris. Los nuevos vasos no pueden reemplazar el flujo de nutrientes necesarios y, en su lugar, pueden provocar muchos problemas tales como hemorragia vítrea, desprendimiento de retina y glaucoma no controlado. Estos problemas se producen porque los nuevos vasos son frágiles y son propensos a sangrar. Si se detecta en sus estadios tempranos, la retinopatía diabética proliferativa a veces puede detenerse con fotocoagulación panretiniana. Sin embargo, en algunos casos, la cirugía de vitrectomía es la única opción. Otras enfermedades del ojo en las que se cree que la angiogénesis desempeña un papel crítico son trastornos coroideos y otros trastornos intraoculares, leucomalacia, y neoplasias y metástasis. La neovascularización coroidea es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que se originan a partir del coroides a través de una rotura en la membrana de Bruch hacia el subepitelio pigmentario de la retina (sub-RPE) o espacio subretiniano. La ubicación, el patrón de crecimiento y el tipo (1 ó 2) de NVC dependen de la edad del paciente y la enfermedad subyacente. La hemorragia y exudación se producen con crecimiento adicional, que explican los síntomas visuales. La neovascularización coroidea (NVC) es una causa importante de pérdida visual. Se estima que se produce NVC en el 5-10% de las personas miopes y se produce prácticamente en todas las roturas coroideas durante la fase de cicatrización; la mayor parte involucionan espontáneamente pero en el 15-30% de los pacientes la NVC puede repetirse y conducir a un desprendimiento macular seroso o hemorrágico con pérdida visual concomitante.

El término 'hipertensión pulmonar' se refiere a un trastorno en el que la tensión arterial en las arterias pulmonares es anómalamente alta. En ausencia de otras enfermedades del corazón o los pulmones, se denomina hipertensión pulmonar primaria. El estrechamiento difuso de las arteriolas pulmonares se produce como resultado de arteriogénesis patológica seguida por hipertensión pulmonar como respuesta al aumento de la resistencia al flujo sanguíneo. La incidencia es de 8 de cada 100.000 personas. Sin embargo, la hipertensión pulmonar también puede producirse como una complicación de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) tales como enfisema, bronquitis crónica o fibrosis intersticial difusa y en pacientes con EPOC asmatiforme. La incidencia de COPD es de aproximadamente 5 de cada 10.000 personas.

Aún un ejemplo adicional de una enfermedad en la que la angiogénesis contribuye a la patología de la enfermedad, y en la que se prevé el tratamiento con las moléculas de unión a antígeno de la presente invención, es el grupo de trastornos inflamatorios. 'Inflamación' tal como se usa en el presente documento significa la reacción no controlada local a una lesión (es decir, física, química o como resultado de una infección) de tejidos vivos, especialmente la reacción local de los vasos sanguíneos pequeños, su contenido y sus estructuras asociadas. El paso de constituyentes de la sangre a través de las paredes de los vasos hacia los tejidos es la característica distintiva de la inflamación, y la acumulación en el tejido así formada se denomina exudado o edema. Cualquier proceso nocivo que dañe el tejido vivo tal como pero sin limitarse a infección con bacterias, calor excesivo, frío, lesión mecánica tal como aplastamiento, ácidos, álcalis, irradiación o infección con virus puede provocar inflamación independientemente del órgano o tejido implicado. Tales 'enfermedades inflamatorias' incluyen reacciones que oscilan desde quemaduras hasta neumonía, lepra, tuberculosis y artritis reumatoide.

La formación de adhesión posoperatoria (POA) es una complicación quirúrgica frecuente en cirugías ginecológicas, pélvicas y cardiológicas. El traumatismo quirúrgico en los tejidos provoca con frecuencia la formación de una cicatriz permanente que conecta el tejido traumatizado con otro órgano. Por tanto, en el sitio de tal daño, los tejidos internos que normalmente permanecen separados con frecuencia se unen entre sí. Las complicaciones que surgen de la formación de adhesión son obstrucciones intestinales, pequeñas obstrucciones del intestino, dolor pélvico crónico, y esterilidad en mujeres. El término "formación de adhesión" en su sentido médico se refiere a conglutinación, el proceso de adhesión o unión de dos superficies o partes. Por ejemplo, la unión de las superficies opuestas de una herida, o superficies opuestas del peritoneo. Además, las adhesiones, en plural, pueden referirse a bandas inflamatorias que conectan superficies serosas opuestas. El término adhesión, tal como se usa en el presente documento, también incluye adhesiones fibrinosas, que son adhesiones que consisten en finos hilos de fibrina que resultan de un exudado de plasma o linfa, o una extravasación de sangre. El queloide, un sobrecrecimiento suave de tejido fibroblástico que surge en un área de lesión u, ocasionalmente, espontáneamente también es una forma de adhesión. Se ha mostrado que la inhibición del factor de crecimiento de la placenta (PIGF) conduce a una supresión notable de la formación de adhesión posoperatoria (documento WO 03/063904).

Se ha demostrado además que enfermedades caracterizadas por resorción ósea, tales como, pero sin limitarse a osteoporosis, pueden beneficiarse de la inhibición de PIGF (documento WO 2004/002524).

Por tanto, según una realización específica las moléculas de unión a antígeno de la presente descripción son particularmente adecuadas para el tratamiento y/o la prevención de crecimiento tumoral y metástasis, enfermedades del ojo, inflamación, formación de adhesión e hipertensión pulmonar.

Una realización particular adicional de la descripción se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno de la

presente invención para la prevención y/o el tratamiento de cáncer, tal como pero sin limitarse a cáncer de mama, pulmón, próstata, cerebro, hígado, páncreas, colon, riñón, útero o médula ósea. Más particularmente, la descripción se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención para la prevención y/o el tratamiento de tumores sólidos tales como pero sin limitarse a cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático y melanomas. Más particularmente, se proporcionan datos en el presente documento que demuestran que los anticuerpos de la presente invención son particularmente adecuados para obtener la regresión de tumores pancreáticos humanos. Se demuestra que los anticuerpos de la presente descripción reducen significativamente el tamaño tumoral *in vivo*, por lo cual se demuestran reducciones en tamaño de hasta aproximadamente el 50%. Por tanto, la presente descripción proporciona métodos y composiciones farmacéuticas para reducir el tamaño tumoral al menos el 20%, más particularmente al menos el 30%, lo más particularmente al menos el 50%.

Una realización particular adicional se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención en el tratamiento o la prevención de trastornos óseos y más específicamente para el tratamiento de estados en los que existe una resorción ósea potenciada tal como por ejemplo osteoporosis u osteomalacia.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas.

Un aspecto importante de la presente invención es que los anticuerpos, fragmentos y derivados de los mismos permiten el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades anteriormente mencionadas sin los efectos secundarios atribuidos a o esperados con otros tratamientos antiangiogénicos, más particularmente tratamientos alternativos que seleccionan como diana factores angiogénicos, tales como VEGF. Ensayos de seguridad preclínicos con anticuerpos anti-VEGF humanos recombinantes demostraron ya en 1999 que la inhibición de VEGF da como resultado la inhibición de la angiogénesis fisiológica, más particularmente la neovascularización en crecimiento óseo longitudinal y formación de cuerpos lúteos (Ryan *et al.*, 1999) *Toxicologic pathology* 27(1):78-86). Estudios recientes describen que los inhibidores de VEGF provocan regresión de vasos en glándulas tiroideas y tráqueas sanas, lo que puede conducir a disfunción de órganos (Baffert *et al.*, 2004, *Circ Res* 94:984-992; Inai *et al.*, 2004 *Am J Pathol* 165:35-52). No obstante, bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF humano está actualmente en el mercado como supresor de la angiogénesis, a pesar de sus efectos observados sobre la cicatrización de heridas, la tensión arterial y el riesgo de trombosis, debido a la eficacia global de este enfoque antiangiogénico sobre la regresión tumoral. Los anticuerpos anti-PlGF y derivados de la presente descripción permiten la inhibición de la angiogénesis no deseada sin estos efectos secundarios observados sobre la tensión arterial, la cicatrización de heridas, el riesgo de trombosis y la regresión de vasos en órganos sanos.

Una realización particular se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden, como principio activo, el anticuerpo monoclonal 16D3 o un fragmento o derivado del mismo, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente descripción comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de la molécula de unión a antígeno. De manera similar, la presente descripción proporciona métodos de tratamiento y/o prevención que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de la molécula de unión a antígeno de la presente descripción.

Una cantidad terapéuticamente eficaz tal como se usa en el presente documento significa una cantidad dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,5 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg) hasta aproximadamente 50 mg/kg, más preferiblemente desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg del mamífero que va a tratarse. Se apreciará que, en vista del largo tiempo de semivida de la mayoría de los anticuerpos humanos de IgG, las moléculas de unión a antígeno que son anticuerpos monoclonales de esta clase disfrutarán de una periodicidad de tratamiento que participa en la comodidad del paciente.

Según aún otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno de la presente invención y otro agente antiangiogénico, así como métodos de tratamiento que proporcionan una administración simultánea o secuencial de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención y otro agente antiangiogénico. De hecho, la presente invención demuestra un efecto aditivo de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención y otros agentes antiangiogénicos, tales como anticuerpos anti-VEGF sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Más particularmente, se demuestra que el uso combinado del anticuerpo 16D3 de la presente invención y Avastin® puede reducir el tamaño tumoral hasta aproximadamente el 70%, mientras que dosificaciones aumentadas de o bien Avastin® solo o bien el anticuerpo anti-PlGF no alcanzan una reducción del tamaño tumoral de más del 55% en las mismas condiciones. Los expertos en la técnica conocen bien otros productos antiangiogénicos adecuados, así como su dosificación habitual dependiendo de la clase a la que pertenecen. Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen inhibidores de VEGF que actúan directamente sobre VEGF, tales como el anticuerpo dirigido contra VEGF comercializado con el nombre Avastin™ o que actúan sobre los receptores de VEGF. Los anticuerpos de la presente descripción hacen posible disminuir la dosificación de por ejemplo agentes antiangiogénicos que inhiben VEGF, que se sabe que inducen una serie de efectos secundarios tal como se describió anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además una cantidad terapéuticamente eficaz de otros compuestos/fármacos activos contra la enfermedad que va a tratarse, más particularmente otros compuestos/fármacos útiles en el tratamiento de crecimiento tumoral, inflamación, enfermedades del ojo e

hipertensión pulmonar.

Se describen portadores farmacéuticos adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas de la descripción por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a ed. (1980) y su formulación la conocen bien los expertos en la técnica. Incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Pueden incluirse componentes adicionales con el fin de controlar la duración de acción del principio activo de anticuerpo monoclonal en la composición. Pueden lograrse por tanto composiciones de liberación controlada mediante la selección de portadores de polímero apropiados tales como por ejemplo poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La velocidad de liberación de fármaco y la duración de acción también pueden controlarse mediante la incorporación del principio activo de anticuerpo monoclonal en partículas, por ejemplo microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, poli(ácido láctico), hidroximetilcelulosa, poli(metacrilato de metilo) y los otros polímeros anteriormente descritos. Tales métodos incluyen sistemas de administración de fármacos coloidales como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y así sucesivamente. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica que comprende el principio activo puede requerir recubrimientos protectores. La forma farmacéutica adecuada para uso inyectable incluye disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de la misma. Por tanto, los portadores típicos incluyen tampones acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y mezclas de los mismos.

Las moléculas de unión a antígeno pueden proporcionarse a un paciente mediante cualquier medio bien conocido en la técnica, es decir, por vía oral, por vía intranasal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía parenteral o mediante cateterización.

Según un aspecto particular de la presente descripción, las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se administran mediante terapia génica. La terapia génica basada en anticuerpos hace posible superar varias limitaciones potenciales asociadas con la administración de anticuerpos tales como producción a gran escala, biodistribución, aclaramiento sanguíneo rápido y escasa retención de anticuerpos monovalentes. La producción *in vivo* hace que los anticuerpos sean menos inmunogénicos y se toleren mejor y da como resultado niveles eficaces y persistentes de moléculas de unión a antígeno o fragmentos de las mismas. Además, los enfoques genéticos hacen posible dotar a las moléculas de unión a antígeno de nuevas funciones. La viabilidad de la producción *in vivo* y la administración sistémica de anticuerpos monoclonales mediante diferentes células/tejidos se ha demostrado usando transferencia génica *in vivo* mediante vectores virales (Pelegrin *et al.*, 2004, Gene Ther 4: 347-356). También se ha demostrado la reducción del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* mediante modificación génica de células de fibrosarcoma con un anticuerpo anti-laminina con actividad antiangiogénica (Sanz *et al.* 2001, Cancer Immunol Immunother 50:557-565).

De este modo, según esta realización, la presente descripción proporciona nucleótidos que codifican para las moléculas de unión a antígeno para su uso en terapia génica en el tratamiento de las enfermedades caracterizadas por angiogénesis patológica descritas en el presente documento. Particularmente, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para la región de cadena pesada variable definida por SEQ ID NO: 2 y/o secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 4, para su uso en terapia génica. Más particularmente, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3, que corresponden a las secuencias de la línea celular 16D3 que codifican para la región de cadena pesada y ligera del anticuerpo 16D3. Asimismo, dentro del contexto de la presente descripción se proporcionan composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una o más de las regiones CDR del anticuerpo monoclonal 16D3 tal como se identifican en SEQ ID Nos. 17 a 22. Las realizaciones particulares incluyen la secuencia que codifica scFv y scFv humanizados de 16D3 tal como, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

El método de tratamiento y/o prevención según la invención puede incluir además el tratamiento o la prevención del mismo estado de angiogénesis patológica mediante la administración, preferiblemente mediante la administración secuencial, al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiangiogénico o antitumoral tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento bajo el encabezamiento de composiciones farmacéuticas. Secuencialmente, tal como se usa en el presente documento, significa que el ligando de la presente invención y el agente antiangiogénesis conocido se administran al paciente secuencialmente pero no simultáneamente.

Aún otro aspecto de la presente descripción se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno de la invención para la detección inmunológica de PIGF en muestras humanas y como componentes de kits adecuados para tal detección. Se conocen en la técnica métodos de detección inmunológica de un antígeno e incluyen, pero no se limitan a, EIA, ELISA y RIA y métodos inmunohistoquímicos. La unión de los anticuerpos murinos de la presente descripción al antígeno PIGF puede detectarse indirectamente por ejemplo por medio de un anticuerpo anti-ratón marcado. Alternativamente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden marcarse directamente. Una realización específica de este aspecto de la descripción se refiere al uso de los anticuerpos contra PIGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos en la identificación de pacientes susceptibles a un tratamiento con

anti-PIGF. Esto es de particular interés en el tratamiento de cáncer.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno de la presente descripción como herramienta de diagnóstico. Se ha demostrado en la técnica que en varios estados patológicos la expresión de PIGF está regulada por incremento. Más particularmente, se han demostrado que una serie de tumores sobreexpresan PIGF. Los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden usarse en el diagnóstico de estos estados patológicos por ejemplo mediante técnicas de obtención de imágenes en las que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se marcan y visualizan *in vivo*. Se conocen en la técnica una variedad de marcadores para obtener imágenes de la unión de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención *in vivo* e incluyen, pero no se limitan a marcadores ópticos (por ejemplo fluorescentes), metálicos y magnéticos, requiriendo cada uno dispositivos de detección (y radiación) específicos. Una realización particular de este aspecto de la descripción se refiere al uso de los anticuerpos en la predicción del pronóstico de la enfermedad y decidir el régimen de tratamiento.

Aún otro aspecto de la presente descripción se refiere al uso de las moléculas de unión a antígeno de la presente descripción en modelos animales en la selección de compuestos para su uso en combinación con terapia anti-PIGF. Tales modelos incluyen pero no se limitan a modelos tumorales mediante los cuales se investiga el crecimiento y desarrollo de células tumorales humanas en ratones nu/nu. La administración combinada del compuesto que va a someterse a prueba y el anticuerpo o fragmento de la presente descripción hace posible identificar si el compuesto tiene un efecto aditivo al efecto observado tras la administración de los anticuerpos o fragmentos de la invención solos. También pueden determinarse de esta forma otros aspectos tales como la eficacia contraria o toxicidad de un compuesto en combinación con un anticuerpo anti-PIGF.

Además de la aplicación terapéutica descrita anteriormente, las secuencias de nucleótidos de la presente invención descritas anteriormente son útiles en la producción de anticuerpos y otros fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo mediante métodos recombinantes. De este modo, la presente descripción proporciona además métodos para producir anticuerpos recombinantes y fragmentos de anticuerpo, que incluyen la clonación y manipulación de genes de anticuerpos, la producción de scFv y otros fragmentos de unión a antígeno usando las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. El protocolo de estos métodos está disponible en la técnica. Adicionalmente, pueden usarse las sondas que hibridan específicamente con las secuencias de nucleótidos de la presente descripción para examinar la expresión de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente descripción.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos sólo.

Ejemplos

EJEMPLO 1 - Producción y caracterización de anticuerpos murinos anti-PIGF humano (16D3)

1. Inmunización de ratones y fusión

Se produjeron anticuerpos monoclonales contra PIGF humano esencialmente tal como se describe por Galfré y Milstein (Galfré F, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Method Enzymol 1981; 73: 3-46). En resumen, se inmunizaron ratones deficientes en PIGF (Luttun *et al.*, 2002, Biochem Biophys Res Comm 295(2):428-34, Carmeliet *et al.* (2001), Nat Med 7:575-593 o el documento WO 01/85796) mediante inyección subcutánea de 50 µg de PIGF-2 humano recombinante (producido en *Pichia*) en adyuvante completo de Freund, seguido dos semanas después por inyección subcutánea con 50 µg de PIGF humano recombinante en adyuvante incompleto de Freund. Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 100 µl) de las colas de los ratones después de 10 días. Se sometieron a prueba los sueros para detectar anticuerpos anti-huPIGF mediante ELISA usando placas de microtitulación recubiertas con PIGF humano como captura, aplicación de sueros diluidos (desde 1/500 hasta 1/8000), e IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa del rábano (HRP) para el marcado.

Después de un intervalo de al menos 6 semanas, se reforzaron los ratones (con respuestas positivas altas) por vía intraperitoneal con 50 µg de PIGF humano recombinante en solución salina en los días 4 y 2 antes de la fusión celular.

Se aislaron células del bazo y se fusionaron con células del mieloma Sp2/0-Ag14. Después de la selección en medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, se seleccionaron clones positivos mediante la aplicación de sobrenadantes de cultivo dentro de ELISA tal como se describió anteriormente.

2. Purificación de anticuerpos en ProSep vA Ultra

Se purificaron anticuerpos a partir del sobrenadante de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad en ProSep vA Ultra (Millipore) según el protocolo del fabricante. En resumen, se añadió NaCl 150 mM al sobrenadante y se cargó el sobrenadante sobre una columna ProSep vA Ultra que se equilibró previamente con PBS. Se lavó la columna con PBS y se eluyó proteína unida con glicina 0,1 M pH 2,8. Se dializó la proteína eluida durante la noche con PBS. Se comprobó la pureza de la proteína eluida en condiciones reductoras y no reductoras mediante SDS-PAGE.

3. Unión de 16D3/hu16D3 (obtenido tal como se describe en el ejemplo 2) a PIGF (véase la figura 1)

Se recubrieron placas de ELISA durante la noche con 1 µg/ml de huPIGF-2 (*Pichia*) en PBS, 100 µL/pocillo, 4°C. Después de bloquear con el 1% de BSA, 1 h, TA, se añadió una serie de diluciones de 16D3/hu16D3, 100 µL/pocillo, se dejó que el anticuerpo se uniera durante 1 h, TA. Se detectó 16D3 unido con HRP-IgG de cabra anti-ser humano o anti-murino (Sigma), 100 µL/pocillo, 1 h, TA. Se reveló el ensayo con OPD.

4. Inhibición de unión de PIGF a receptor huFit-1 (véase la figura 2)

Se recubrieron placas de ELISA durante la noche con 1 µg/ml de huFit-1 (R&D Systems), 200 µL/pocillo, durante la noche, 4°C. Después de bloquear con el 1% de BSA, 1 h, TA, se añadió una serie de diluciones de 16D3/hu16D3, 100 µL/pocillo, y se añadieron 100 µL/pocillo adicionales de huPIGF-2. Después de una incubación de 2 horas a TA, se detectó el PIGF unido con anticuerpo de cabra anti-huPIGF (R&D Systems), 180 µL/pocillo, 1 h, TA, seguido por una incubación con RAG-HRP (DAKO), 1 h, TA. Se reveló el ensayo con OPD.

5. Caracterización adicional de 16D3 y Fab 16D3 con experimentos de Biacore

• Inhibición: se inmovilizó rhuPIGF-2 (*Pichia*, TX) en un chip CM5 usando una química de EDC/NHS (kit de acoplamiento a amina, Biacore), dando 412 RU. Se inyectó el 16D3 seguido por la quimera rhuFit-1/Fc (R&D Systems). Esto también se llevó a cabo con tampón en lugar del anticuerpo de ratón. Estos también se inyectaron sobre un canal de flujo de control negativo y estos valores ya se restaron. Este ensayo se llevó a cabo en un tampón fosfato a pH 9,6.

En comparación con la unión máxima del rhuFit-1 al rhuPIGF-2, la señal de rhuFit-1 se reduce si en primer lugar se inyectan 16D3 ó 16D3Fab (figura 3).

6. Clonación y secuenciación de las regiones variables de ratón de 16D3

• Aislamiento de ARNm: Se aisló el ARNm de células de hibridoma de 16D3 usando el microkit de purificación de ARNm QuickPrep™ (Amersham Biosciences). Se usó este ARNm para preparar ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena (Amersham Biosciences) con el cebador pd(N)₆ disponible en el kit.

• PCR: Se encontraron las secuencias de las partes variables de la cadena pesada y ligera realizando una PCR con una colección de cebadores: 8 cebadores que comenzaban en la secuencia líder y 2 en la región constante de la cadena pesada, 11 cebadores que comenzaban en la secuencia líder y 1 en la región constante de la cadena ligera. Se llevaron a cabo 8 y 11 reacciones de PCR con combinaciones diferentes de los cebadores.

Cebadores usados para la cadena pesada del anticuerpo 16D3:

MHVR3 5'-ATG GRA TGG AGC TGK ATC WTT HTC-3' (SEQ ID NO: 9)

MHCR1 5'-CAS AYM CAG GGG CCA GTG GAT AGA C-3' (SEQ ID NO: 10)

Cebadores usados para la cadena ligera del anticuerpo 16D3:

MKVR3 5'-ATG RAG TCA CAK ACY CAG GTC TTY RTA-3' (SEQ ID NO: 11)

MKCR1 5'-GCT CAC TGG ATG GTG GGA AGA TGG-3' (SEQ ID NO: 12)

Configuración de PCR: desnaturalización 10 min. 94°C, desnaturalización 30 s 94°C, hibridación 30 s 55°C, prolongación 1 min. 72°C, prolongación 5 min. 72°C, número de ciclos 30.

La redundancia en la secuencia de SEQ ID NO: 9 a 11 se indica usando las abreviaturas convencionales R = A o G, K= G o T, W= A o T, H= A o C o T, S= C o G, Y= C o T, M= A o C.

• Clonación y secuenciación: Se cargaron los productos de PCR en gel de agarosa, se seleccionaron las bandas correctas, se purificaron (kit de extracción en gel QIAquick®, Qiagen GmbH) y se clonaron en el vector pCR®4Blunt-TOPO® suministrado en el kit de clonación de PCR para la secuenciación Zero Blunt® TOPO® (Invitrogen™ life technologies). Se preparó ADN de plásmido usando el kit de aislamiento de plásmido de alta pureza (Roche Diagnostics GmbH) y se secuenciaron los insertos usando los cebadores inversos T7 y M13 en ABI PRISM™ 310 (PE Applied Biosystems).

• Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 16D3 se representan en las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4. (véase la figura 11)

EJEMPLO 2 - Producción y caracterización de anticuerpos humanizados anti-PIGF humano (16D3)

1. Construcción de 16D3 humanizado

Humanización de las regiones variables

- Mutaciones: Se realizaron las siguientes mutaciones con el fin de humanizar las partes variables del anticuerpo de ratón 16D3:

Cadena pesada:	I2V
	P9A
	K40A
	T111L
Cadena ligera:	S5T
	S9D
	A15L
	K18R
	R22N
	L89V

5

- Se realizaron las mutaciones usando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuickChange® (Stratagene®). Pueden usarse de 1 a 5 cebadores que contienen las mutaciones en 1 PCR. Después, se recogieron colonias de transformación y se secuenció el ADN para determinar el clon con más mutaciones puntuales. Se tomó este clon para repetir este procedimiento hasta que todas las mutaciones estuvieran presentes en la secuencia.

10 *Unión de las regiones variables a una región constante IgG humana:*

Realizando una PCR se obtuvieron las partes variables humanizadas de la cadena pesada y ligera a las que se añadieron los sitios de restricción apropiados.

Cebadores para la parte variable de la cadena ligera:

Cebador 1: 5'-CCACCGGT GAC ATT GTG CTG ACC CAG TCT CC-3' (SEQ ID NO: 13)

15 Cebador 2: 5'-CACCGTACG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC CGA G-3' (SEQ ID NO: 14)

Cebadores para la parte variable de la cadena pesada:

Cebador 3: 5'-CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT G-3' (SEQ ID NO: 15)

Cebador 4: 5'-GATGGGCCCTTGGTCGACGC TGA GGA GAC TGT GAG CAG GG-3' (SEQ ID NO: 16)

20 Configuración de PCR: desnaturalización 5 min. 94°C, desnaturalización 30 s 94°C, hibridación 30 s 60°C, prolongación 30 s 72°C, prolongación 5 min. 72°C, número de ciclos 25.

Se cargaron los productos de PCR en gel de agarosa, se seleccionaron las bandas correctas y se purificaron (kit de extracción en gel QIAquick®, Qiagen GmbH). Se dirigió con Sall el producto de PCR de la parte variable de la cadena pesada de 16D3, el vector pKANEO-MCS50-Hleu-var #24 que contenía la parte constante completa de la cadena pesada de un anticuerpo humano (IgG4), con Eco47III y Sall y se ligó. En primer lugar se clonó el producto de PCR de la parte variable de la cadena ligera en el vector pCR®4Blunt-TOPO® suministrado en el kit de clonación de PCR para secuenciación Zero Blunt® TOPO® (Invitrogen™ life technologies). Se cortó la parte variable de la cadena ligera mediante Agel y BsiWI y se clonó dentro del vector pKANEO-CM30-L-var #7 que ya contenía la parte constante de una cadena ligera kappa humana. Se ensamblaron ambos vectores en un vector sacando del vector el casete de expresión de la cadena ligera usando PmeI y PacI y añadiéndolo al vector que contenía la cadena pesada.

30

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las partes variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo

humanizado 16D3 se representan en las SEQ ID NO 5, 6, 7 y 8 (véase la figura 12).

2. Expresión transitoria de hu16D3

Se expresó transitoriamente Hu16D3-IgG4κ en células HEK 293 usando el sistema de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se purificó Hu16D3 a partir del sobrenadante usando cromatografía de afinidad en proSep vA Ultra. Se comprobó hu16D3 para determinar la pureza mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Se sometió adicionalmente a prueba Hu16D3 para determinar la unión a huPIGF y para determinar la inhibición de la unión HuPIGF/huFLT-1 mediante ELISA (véanse las figuras 1 y 2).

EJEMPLO 3: Investigación *in vivo* de la inhibición de crecimiento tumoral con anticuerpos anti-PIGF

1. Descripción general de materiales y métodos

10 *Cultivo celular*

Las líneas celulares pancreáticas murinas Panc02 y la línea celular pancreática humana DanG son un obsequio de S. Rosewicz (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Alemania). Las líneas celulares humanas de mama MDA-MB, colon LOVO y melanoma Mel2a se obtuvieron del colección americana de cultivos tipo (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.). Todas las células se cultivaron tal como se recomienda. Se usaron anticuerpos murinos 16D3 anti-PIGF para todos los experimentos *in vivo*, para evitar la reacción inmunitaria al anticuerpo.

Experimentos con animales

Todos los procedimientos con animales fueron completamente aprobados por el comité institucional para el uso y cuidado de animales. Se alojaron ratones hembra nu/nu NMRI en condiciones semiestériles y se usaron de manera rutinaria a las 8-10 semanas de edad (peso aproximado, 25 g). Para la preparación de la fuente tumoral, se tripsinizaron las células tumorales para preparar una suspensión de una única célula, se lavaron con PBS. El aglomerado centrifugado se re-suspendió en 200 µl de PBS y se inyectó por vía subcutánea en el costado derecho de los ratones. Para el modelo de tumor pancreático ortotópico, se inyectaron 1×10^6 células tumorales en 30 µl de PBS dentro de la cabeza del páncreas mediante laparotomía ventral de ratones hembra C57B16 a la edad de 9-10 semanas. Antes de los procedimientos, se anestesiaron los ratones con cetamina (90 mg/kg de peso corporal) y xilazina (9 mg/kg de peso corporal).

Administración de fármacos (es decir anticuerpos, vehículo, etc.)

Se inició el tratamiento con anticuerpos o control de vehículo cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm³. Se administraron anticuerpos P15D11D4 (documento WO 01/85796), 16D3, 1C8 o vehículo a las dosis indicadas por vía intraperitoneal cada dos días. Se inyectó Avastin a las dosis indicadas por vía intraperitoneal dos veces por semana.

Mediciones de tumores

Se midieron tumores en crecimiento por vía subcutánea cada dos días usando un calibre, y se calcularon los volúmenes de los tumores usando la fórmula $p/6 (w1 \times w2 \times w2)$, en la que 'w1' y 'w2' representan el diámetro tumoral más grande y más pequeño, respectivamente. Cuando se sacrificaron los ratones se midieron los tumores en crecimiento ortotópicos del páncreas después de una laparotomía ventral usando el mismo método.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student bilateral para observaciones emparejadas usando el software estadístico GraphPad (GraphPad Software Inc., San-Diego, CA). Todos los datos se expresan como media ± EEM, a menos que se indique lo contrario. *p<0,5, **p<0,01, a menos que se indique lo contrario.

40 2. Inhibición de crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto DanG pancreático humano subcutáneo con el anticuerpo 16D3 murino anti-hPIGF.

Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm³, se inició el tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF (16D3, 50 mg/kg de peso corporal; n=10), anticuerpo anti-mPIGF (PL5D11D4 (obtenido tal como se describe en el documento WO 01/85796; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG control (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), una combinación de anticuerpo anti-hPIGF y anticuerpo anti-mPIGF (cada uno 25 mg/kg de peso corporal; n=10) y vehículo (n=10). Se inyectaron anticuerpos i.p. cada dos días. (A) Se midieron los tumores cada dos días y se calculó el volumen tumoral usando la fórmula $W1 \times W2 \times W2 \times p / 2$, por la que W1 representa el diámetro más grande y W2 el diámetro más pequeño. (B) Se sacrificaron los ratones al día 18 después de la inoculación del tumor, se resecaron los tumores y se pesaron. Volumen tumoral medio: vehículo: $915 \pm 90 \text{ mm}^3$, IgG: $\pm 89 \text{ mm}^3$, PL5D11D4: $832 \pm 118 \text{ mm}^3$, 16D3: $521 \pm 83 \text{ mm}^3$, PL5D11D4 + 16D3: $497 \pm 86 \text{ mm}^3$.

Los resultados, tal como se muestran en la figura 4, muestran que la administración del anticuerpo 16D3 anti-PIGF

humano tiene una influencia clara sobre el peso y tamaño tumoral.

3. Anticuerpo anti-hPIGF inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto DanG pancreático humano subcutáneo de una manera dependiente de la dosis.

5 Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm^3 , se inició el tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF, IgG (1C8; 50 mg/kg), 16D3 (50 mg/kg, 37,5 mg/kg, 25 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal; n=10 para cada concentración) y vehículo (n=10). (B) Se sacrificaron los ratones al día 18 después de la inoculación del tumor.

10 Los resultados se muestran en la figura 5. Volumen tumoral medio \pm EEM: 16D3, 50 mg/kg de peso corporal: $450 \pm 37 \text{ mm}^3$; 37,5 mg/kg de peso corporal: $469 \pm 97 \text{ mm}^3$; 25 mg/kg de peso corporal: $493 \pm 107 \text{ mm}^3$; 12,5 mg/kg de peso corporal: $693 \pm 107 \text{ mm}^3$; 1C8: $865 \pm 109 \text{ mm}^3$; vehículo: $889 \pm 100 \text{ mm}^3$.

4. Anticuerpo anti-huPIGF inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto MDA-MB de mama humano subcutáneo.

15 Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^7 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm^3 , tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) y vehículo (n=10).

Los resultados se muestran en la figura 6 (y la tabla 1 a continuación).

Tabla 1

	Media	EEM	N	Valor de P
Peso del TM PBS	1086	154,1	10	
Peso del TM 16D3	586,6	71,89	10	0,0088
Tamaño del TM PBS	991,5	160,8	10	
Tamaño del TM 16D3	485,9	63,76	10	0,0091

20 5. Anticuerpo anti-huPIGF inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto LOVO de colon humano subcutáneo.

Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^7 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm^3 , tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) y vehículo (n=10).

Los resultados se muestran en la figura 7 y la tabla 2 a continuación.

25 Tabla 2

	Media	EEM	N	Valor de P
Peso del TM PBS	669,3	103	10	
Peso del TM 16D3	415	65,85	10	0,052
Tamaño del TM PBS	568,3	95,38	10	
Tamaño del TM 16D3	306,4	50,27	10	0,0258

6. Anticuerpo anti-huPIGF inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto Mel2a de melanoma humano subcutáneo.

30 Se inyectaron por vía subcutánea 4×10^6 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm^3 , tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) y vehículo (n=10).

Los resultados se muestran en la figura 8 y la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

	Media	EEM	N	Valor de P
Peso del TM PBS	753,3	87,26	10	

Peso del TM 16D3	468,9	70,57	9	0,023
-------------------------	-------	-------	---	-------

EJEMPLO 4: Investigación *in vivo* del efecto del tratamiento con anticuerpos 16D3 sobre la pérdida de peso.

Los materiales y métodos fueron tal como se describieron para el ejemplo 3.

5 Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm^3 , se inició el tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF (16D3, 50 mg/kg de peso corporal; n=10), anticuerpo anti-mPIGF (PL5D11D4; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG control (C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), una combinación de anticuerpo anti-hPIGF y anticuerpo anti-mPIGF (cada uno 25 mg/kg de peso corporal; n=10) y vehículo (n=10). Se inyectaron anticuerpos i.p. cada dos días. Se midió el peso corporal de los ratones al primer y último día de tratamiento con anticuerpos. Se restó el peso tumoral del peso corporal antes de calcular el porcentaje de pérdida de peso corporal.

Los resultados se muestran en la figura 9. Se muestra que el anticuerpo anti-hPIGF previene la pérdida de peso corporal en este modelo de tumor de xenoinjerto DanG pancreático humano subcutáneo.

EJEMPLO 5: Combinación de anticuerpo anti-hPIGF y un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento de crecimiento tumoral

15 Los materiales y métodos fueron tal como se describieron para el ejemplo 3.

20 Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células tumorales dentro del costado derecho de ratones hembra nu/nu NMRI de 11 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 60 mm^3 , tratamiento con anticuerpo anti-hPIGF (16D3, 50 mg/kg, 37,5 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal i.p. cada dos días; n=10 para cada concentración), Avastin (15 mg/kg y 5 mg/kg de peso corporal, i.p. dos veces por semana, n=10 cada uno) y una combinación de anticuerpo anti-hPIGF (12,5 mg/kg de peso corporal) y Avastin (5 mg/kg de peso corporal; n=10). Se sacrificaron los ratones después de 20 días de la inoculación del tumor.

25 Los resultados se muestran en la figura 10. Volumen tumoral medio \pm EEM: 1C8, 37; 37,5 mg/kg de peso corporal: $954 \pm 164 \text{ mm}^3$; 12,5 mg/kg de peso corporal: $1398 \pm 236 \text{ mm}^3$; IgG: $1789 \pm 231 \text{ mm}^3$; Avastin: 15 mg/kg de peso corporal: $828 \pm 186 \text{ mm}^3$; 5 mg/kg de peso corporal: $926 \pm 202 \text{ mm}^3$; Avastin + 16D3: $569 \pm 94 \text{ mm}^3$. Se observa que el anticuerpo anti-hPIGF y Avastin ejercen un efecto adicional sobre la inhibición de crecimiento tumoral en un tumor DanG pancreático humano subcutáneo.

EJEMPLO 6: Producción de scFv de 16D3

30 Se amplificaron mediante PCR las secuencias de las partes variables de la cadena pesada y ligera (SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente, obtenidas tal como se describió en el ejemplo 1) usando cebadores con los sitios de unión de restricción apropiados y ligador. Después de una PCR de SOE (corte y empalme génico mediante extensión de solapamiento) se clonó el scFv en pEE14.4 (sitios de clonación HindIII-EcoRI) (figura 12).

35 Se tranfectó este scFvhp16D3/pEE14.4 a células de CHO-K1 después de una linealización con BamHI usando Fugene 6 (Boehringer Mannheim) y se subclonó dos veces mediante dilución. Se obtuvo y produjo un scFv hp16D3 monoclonal, 6C5D4. Este clon también se transfirió transitoriamente en células 293 mediante Producell en paralelo con scFv hp16D3/pKANEO-MCS50-dhfr1 (sitios de clonación NheI-NotI) (figura 13).

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos del scFv de 16D3 se proporciona como SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente. También se proporciona en la figura 15 la secuencia de aminoácidos que demuestra las regiones variables de cadena pesada y ligera, la secuencia de ligador y la etiqueta de HA y etiqueta de His.

EJEMPLO 7: humanización de scFv 16D3

40 La humanización de las regiones variables del scFv se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo 2. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del scFv humanizado de 16D3 se proporcionan en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, respectivamente. También se proporciona en la figura 15 la secuencia de aminoácidos que demuestra las regiones variables de cadena pesada y ligera, la secuencia de ligador y la etiqueta de HA y etiqueta de His del scFv humanizado.

45 EJEMPLO 8: Producción de Fab 16D3 humanizados

1. Amplificación de los fragmentos VH y VL a partir de scFv16D3 humanizado

Cebadores para la amplificación de fragmentos VH de scFv16D3 humanizado:

16D3Vhbackblunt 5'-CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG-3' (SEQ ID NO: 27)

16D3VhforSall 5'-GATGGGCCCTTGGTTCGACGCTGAGGAGACTGTGAGCAGGG-3' (SEQ ID NO: 28)

Cebadores para la amplificación de fragmentos VL de scFv16D3 humanizado:

16D3VLBackAgeI 5'-CCACCGGTGACATTGTGCTGACCCAGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 29)

16D3VLForBsiWI 5'-CACCGTACGTTTTATTTCCTCACTTTGTCCCCGAG-3' (SEQ ID NO: 30)

2. Construcción de vectores de cadena pesada y ligera

- 5 En primer lugar se clonó el producto de PCR de la cadena ligera dentro de un vector pCR4blunt-TOPO. Después de la secuenciación se eliminó la cadena ligera mediante digestión con AgeI y BsiWI y se clonó dentro del vector pKNEO-CM30-Lvar#7. Después de la digestión se clonó el producto de PCR de la cadena pesada directamente en pKNEO-MCS50-Fabvar#3.

3. Unión de los constructos de cadena pesada y ligera

- 10 Ambos vectores (descritos anteriormente), que contenían el segmento ligero y pesado, se unieron entre sí mediante la eliminación del casete que contenía el segmento ligero y su adición al vector que contenía el segmento pesado usando las enzimas PmeI y PacI, para obtener el constructo final, hp16D3mutcmpIFab/pKNEO-MCS50-Fabvar#3 (véase la figura 16).

15 EJEMPLO 9. Análisis de unión a antígeno e inhibición de la interacción PIGF/Flt-1 mediante scFv 16D3 y scFv16D3 humanizado (figura 14)

1. ELISA de unión a antígeno

- 20 Se recubrieron placas de ELISA durante la noche con 1 µg/ml de huPIGF-1 en PBS, 200 µL/pocillo, 4°C. Después de bloquear con el 1% de BSA, 1 h, TA, se añadió una serie de diluciones de scFv16D3/scFv16D3 humanizado, 200 µL/pocillo, se permitió que el fragmento de anticuerpo se uniera durante 1 h, TA. Se detectó scFv16D3 unido con anticuerpo murino anti-HA (180 µL/pocillo, 1 h, TA) seguido por incubación con HRP-IgG de cabra anti-murino (Sigma), 170 µL/pocillo, 1 h, TA. Se reveló el ensayo con OPD.

2. Inhibición de interacción PIGF/Flt-1 mediante ELISA

- 25 Se recubrieron las placas de ELISA durante la noche con 1 µg/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 µL/pocillo, durante la noche, 4°C. Después de bloquear con el 1% de BSA, 1 h, TA, se añadió una serie de diluciones de scFv16D3/scFv16D3 humanizado, 100 µL/pocillo, y se añadieron 100 µL/pocillo adicionales de huPIGF-2. Después de una incubación de 2 horas a TA, se detectó PIGF unido con anticuerpo de cabra anti-huPIGF (R&D Systems), 180 µL/pocillo, 1 h, TA, seguido por una incubación con RAG-HRP (DAKO), 1 h, TA. Se reveló el ensayo con OPD.

EJEMPLO 10. Análisis de unión a antígeno e inhibición de la interacción PIGF/Flt-1 mediante Fab16D3 humanizado

1. ELISA de unión a antígeno

- 30 Se recubrieron placas de ELISA durante la noche con 1 µg/ml de huPIGF-1 en PBS, 100 µL/pocillo, 4°C. Después de bloquear con el 1% de BSA, 1 h, TA, se añadió una serie de diluciones de Fab16D3 humanizado, 100 µL/pocillo, se permitió que el fragmento de anticuerpo se uniera durante 1 h, TA. Se detectó Fab16D3 humanizado unido con HRP-IgG anti-ser humano (específico de Fab) (100 µL/pocillo, 1 h, TA). Se reveló el ensayo con OPD. Los resultados se proporcionan en la figura 17A.

- 35 2. Inhibición de la interacción PIGF/Flt-1 mediante ELISA

- 40 Se recubrieron placas de ELISA durante la noche con 1 µg/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 µL/pocillo, durante la noche, 4°C. Después de bloquear con el 1% de BSA, 1 h, TA, se añadió una serie de diluciones de Fab16D3 humanizado, 100 µL/pocillo, y se añadieron 100 µL/pocillo adicionales de huPIGF-2. Después de una incubación de 2 horas a TA, se detectó el PIGF unido con anticuerpo de cabra anti-huPIGF (R&D Systems), 180 µL/pocillo, 1 h, TA, seguido por una incubación con RAG-HRP (DAKO), 1 h, TA. Se reveló el ensayo con OPD. Los resultados se proporcionan en la figura 17B.

45

EJEMPLO 11. Determinación de valores de K_D

Los valores de K_D para 16D3, IgG4-16D3 humanizado, scFv16D3 humanizado y Fab16D3 humanizado se determinaron por Biacore. Los resultados se proporcionan en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Tabla de resumen de valores de K_D

proteína inmovilizada	anticuerpo inyectado	K_D (M)
rhuPIGF-2 <i>Pichia</i>	scFvhp16D3mut	1,95E-10
rhuPIGF-2 <i>Pichia</i>	hp16D3mousecomplAB	2,90E-10
rhuPIGF-2 <i>Pichia</i>	hp16D3mutcomplABlgG4	1,61E-10
rhuPIGF-2 <i>Pichia</i>	hp16D3mutcomplFab	1,31E-10
Valores de K_D de 16D3, IgG4-16D3 humanizado, Fab16D3 humanizado y scFv16D3 humanizado.		

5

Lista de secuencias

<110> Thromb-X nv
 Collen Research Foundation vzw
 Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie (VIB)
 5 Stassen, Jean-Marie
 Carmeliet, Peter
 Collen, Désiré

<120> Anticuerpo anti-PIGF novedoso

<130> T6311-EP

10 <150> Documento US 60/664.768
 <151> 24-03-2005

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 15 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 20 <222> (1)..(348)
 <223> parte variable de ratón de la cadena pesada de 16D3

<400> 1

cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

tat ata aac tgg gtg aag ttg aag cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc 336
 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

aca gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

25 <210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 565 481 T3

<400> 2

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 336

5 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (336)

10 <223> parte variable de ratón de la cadena ligera de 16D3

<400> 3

ES 2 565 481 T3

gac att gtg ctg tca cag tct cca tcc tcc ctg gct gtg tca gca gga 48
 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

gag aag gtc act atg cgc tgc aaa tcc agt cag agt ctg ctc aac agt 96
 Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa cca ggg cag 144
 Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggg gtc 192
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgc aag caa 288
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5

10 <211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 565 481 T3

<220>

<223> Fragmento de anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(348)

<223> parte variable humanizada de la cadena pesada de 16D3

<400> 5

cag gtc cag ctg cag cag tct gga gcc gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

tat ata aac tgg gtg aag ttg gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc ctg ctc 336
 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110

aca gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 6

ES 2 565 481 T3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de anticuerpo humanizado

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(336)

<223> parte variable humanizada de la cadena ligera de 16D3

<400> 7

ES 2 565 481 T3

gac att gtg ctg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tca ctg gga 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gag cgg gtc act atg aac tgc aaa tcc agt cag agt ctg ctc aac agt 96
 Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa cca ggg cag 144
 Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggg gtc 192
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

atc agc agt gtg cag gct gaa gac gtc gca gtt tat tac tgc aag caa 288
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 8

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

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

10 <210> 9

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 9
 atggratgga gctgkacwt thtc 24

 <210> 10
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 10
 15 casaymcagg ggccagtgga tagac 25

 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 11
 atgragtac akacycaggt cttyrta 27

 <210> 12
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 12
 30 gctcactgga tgggggaag atgg 24

 <210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 13
 ccaccgggga cattgtgctg acccagtctc c 31

 <210> 14
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 14
 caccgtacgt tttattcca actttgtccc cgag 34

 <210> 15
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 15
 caggtccagc tgcagcagtc tg 22

5 <210> 16
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 16
 gatgggccct tggtcgacgc tgaggagact gtgagcaggg 40

<210> 17
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> misc
 <222> (1)..(8)
 20 <223> 16D3 de cadena pesada CDR1

<400> 17
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 18
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(8)
 30 <223> 16D3 de cadena pesada CDR2

<400> 18
Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 19
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 40 <223> 16D3 de cadena pesada CDR3

<400> 19
Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 20
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> misc
 <222> (1)..(12)
 50 <223> 16D3 de cadena ligera CDR1

<400> 20
Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe
1 5 10

<210> 21
 <211> 3
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> misc
 <222> (1)..(3)
 10 <223> 16D3 de cadena ligera CDR2

<400> 21
Trp Ala Ser
1

<210> 22
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(8)
 20 <223> 16D3 de *cadena ligera* CDR3

<400> 22
Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr
1 5

<210> 23
 <211> 786
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ScFv de 16D3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(786)
 30

<220>
 <221> misc
 <222> (1)..(348)
 35 <223> Cadena pesada

<220>
 <221> misc
 <222> (349)..(393)
 <223> Ligador

40 <220>
 <221> misc
 <222> (394)..(729)
 <223> Cadena ligera

45 <220>
 <221> misc
 <222> (736)..(762)
 <223> Etiqueta de HA

50 <220>
 <221> misc
 <222> (769)..(786)
 <223> Etiqueta de His

<400> 23

cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct	48
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
tat ata aac tgg gtg aag ttg aag cct gga cag gga ctt gag tgg att	144
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc	192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag etc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc	336
Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu	
100 105 110	
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggt gga	384
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Ser Gly Gly	
115 120 125	
ggt ggt tct gac att gtg ctg tca cag tct cca tcc tcc ctg gct gtg	432
Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val	
130 135 140	
tca gca gga gag aag gtc act atg cgc tgc aaa tcc agt cag agt ctg	480
Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu	
145 150 155 160	
ctc aac agt gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa	528
Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	
165 170 175	
cca ggg cag tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa	576
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu	
180 185 190	
tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tot ggg aca gat ttc	624
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
195 200 205	
act ctc acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac	672
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr	
210 215 220	
tgc aag caa tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg	720
Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu	
225 230 235 240	
gaa ata aaa ggt tct tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt tct	768
Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser	
245 250 255	
cat cat cac cat cac cat	786
His His His His His His	
260	

ES 2 565 481 T3

<210> 24
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 24

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val

ES 2 565 481 T3

130

135

140

Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
145 150 155 160

Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser
245 250 255

His His His His His His
260

<210> 25

<211> 786

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ScFv de 16D3 humanizado

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(786)

<220>

<221> misc

<222> (1)..(348)

<223> Cadena pesada

15 <220>

<221> misc

<222> (349)..(393)

<223> ligador

<220>

20 <221> misc

<222> (394)..(729)

<223> Cadena ligera

<220>

<221> misc

25 <222> (736)..(762)

<223> Etiqueta de HA

<220>

ES 2 565 481 T3

<221> misc
 <222> (769)..(786)
 <223> Etiqueta de HA

<400> 25

cag gtc cag ctg cag cag tct gga gcc gag ctg gtg aag cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
tat ata aac tgg gtg aag ttg gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att	144
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc	192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc ctg ctc	336
Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu	
100 105 110	
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggt gga	384
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
115 120 125	
ggt ggt tct gac att gtg ctg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg	432
Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val	

5

ES 2 565 481 T3

130	135	140	
tca ctg gga gag cgg gtc act atg aac tgc aaa tcc agt cag agt ctg			480
Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu			
145	150	155	160
ctc aac agt gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa			528
Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys			
	165	170	175
cca ggg cag tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa			576
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu			
	180	185	190
tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc			624
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	195	200	205
act ctc acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac gtc gca gtt tat tac			672
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr			
	210	215	220
tgc aag caa tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg			720
Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu			
	225	230	235
gaa ata aaa ggt tct tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt tct			768
Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser			
	245	250	255
cat cat cac cat cac cat			786
His His His His His His			
	260		

<210> 26

<211> 262

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 26

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

<400> 27
 caggtccagc tgcagcagtc tg 22

 <210> 28
 <211> 40
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 28
 10 gatgggccct tggcgcagc tgaggagact gtgagcaggg 40

 <210> 29
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 29

 ccaccgtga cattgtgctg acccagtctc c 31

 <210> 30
 20 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

 25 <400> 30

 caccgtacgt tttattcca actttgtccc cgag 34

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, que es capaz de unirse a PIGF e inhibirlo y comprende una secuencia de la cadena pesada variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente y una secuencia de la cadena ligera variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, para su uso en un método para reducir los efectos secundarios en una terapia para inhibir la angiogénesis no deseada con un inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF, donde dichos efectos secundarios están causados por dicho inhibidor de VEGF y donde la dosificación de dicho inhibidor de VEGF es menor en comparación con la dosificación en una terapia para inhibir la angiogénesis no deseada con dicho inhibidor de VEGF.
2. Un anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, que es capaz de unirse a PIGF y comprende una secuencia de la cadena pesada variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente y una secuencia de la cadena ligera variable de la cual la secuencia de la región CDR1, CDR2 y CDR3 corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente, para su uso en un método para inhibir la angiogénesis no deseada en una terapia con un inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF, donde la dosificación de dicho inhibidor de VEGF es menor en comparación con la dosificación en una terapia para inhibir la angiogénesis no deseada con dicho inhibidor de VEGF.
3. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo y dicho inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF se combinan mediante una administración simultánea o secuencial.
4. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha angiogénesis no deseada es un estado patológico seleccionado del grupo que consiste en cáncer, inflamación, formación de adhesiones, enfermedades del ojo, hipertensión pulmonar y permeabilidad vascular.
5. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo y dicho inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF se combinan mediante la administración simultánea o secuencial.
6. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha angiogénesis no deseada es un estado patológico seleccionado del grupo que consiste en cáncer, inflamación, formación de adhesiones, enfermedades del ojo, hipertensión pulmonar y permeabilidad vascular.
7. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho inhibidor de VEGF que actúa directamente sobre VEGF es un anticuerpo inhibidor contra VEGF.
8. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene una identidad de secuencia dentro de las regiones variables de la cadena pesada y ligera fuera de las regiones CDR que es al menos el 70%, particularmente al menos el 80%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% idéntica a las secuencias de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.
9. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 8, que es el anticuerpo 16D3, tal como es producido por la línea celular de hibridoma depositada como LMBP6399CB, o un fragmento o derivado del mismo.
10. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho fragmento es un scFv.
11. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho fragmento es un scFv del anticuerpo 16D3, tal como es producido por la línea celular de hibridoma depositada como LMBP6399CB, cuya secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.
12. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es un anticuerpo humanizado, fragmento o derivado del mismo que comprende las regiones de la cadena ligera y/o pesada variables que tiene al menos el 80%, particularmente al menos el 85%, más particularmente al menos el 90%, lo más particularmente al menos el 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.
13. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 9, que es un anticuerpo 16D3 humanizado, tal como es producido por la línea celular de hibridoma depositada como LMBP6399CB, o un fragmento o derivado del mismo.
14. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho fragmento es un scFv humanizado.
15. El anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo, cualquiera de las

ES 2 565 481 T3

reivindicaciones 1 a 5, 9 o 10, donde dicho fragmento es un scFv humanizado del anticuerpo 16D3, tal como es producido por la línea celular de hibridoma depositada como LMBP6399CB, cuya secuencia corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 26.

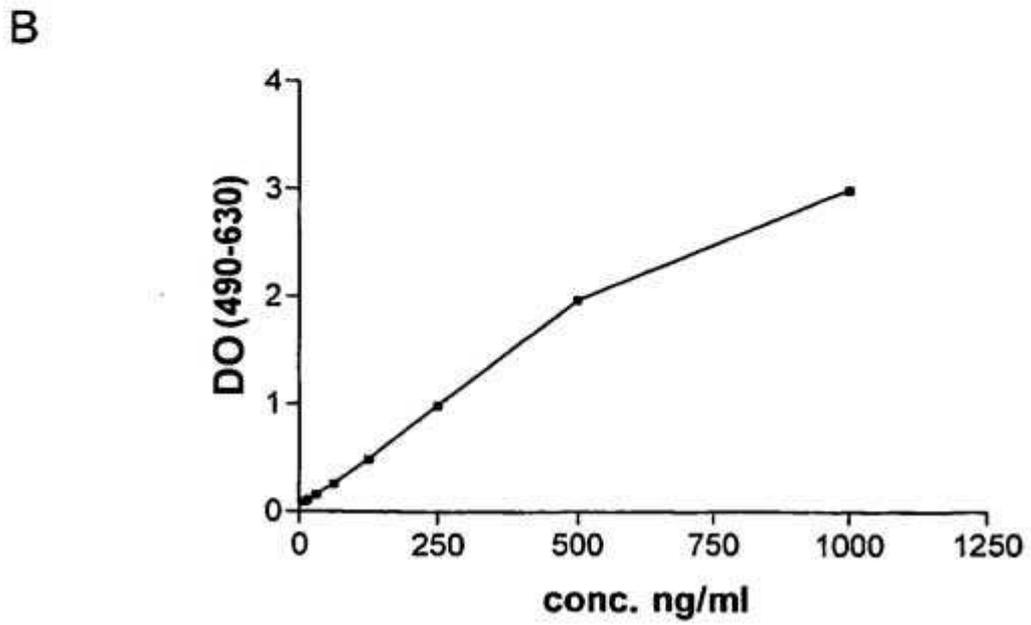
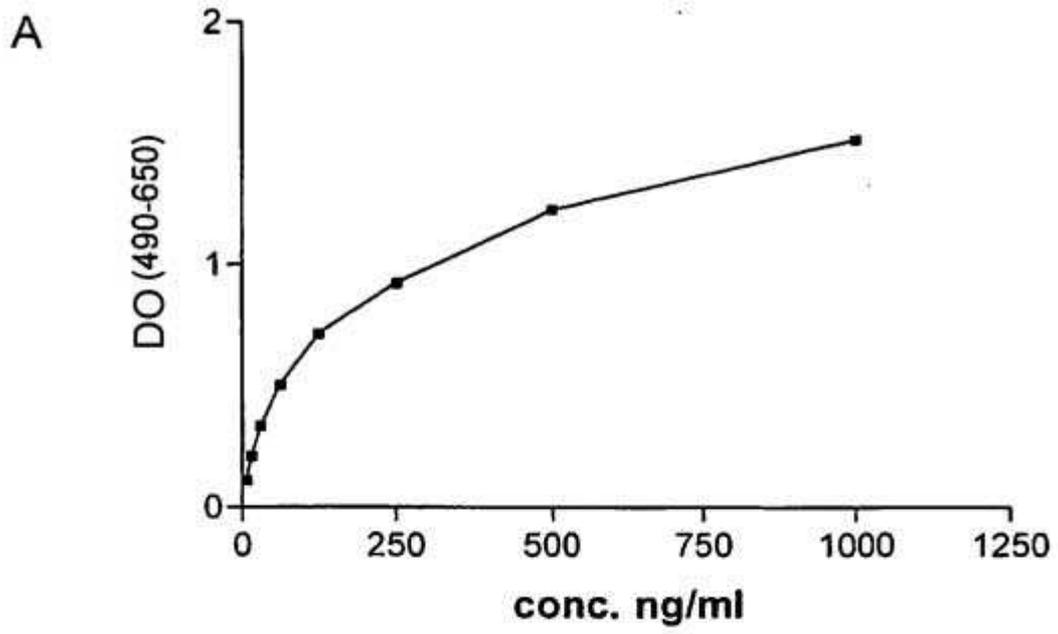


Figura 1

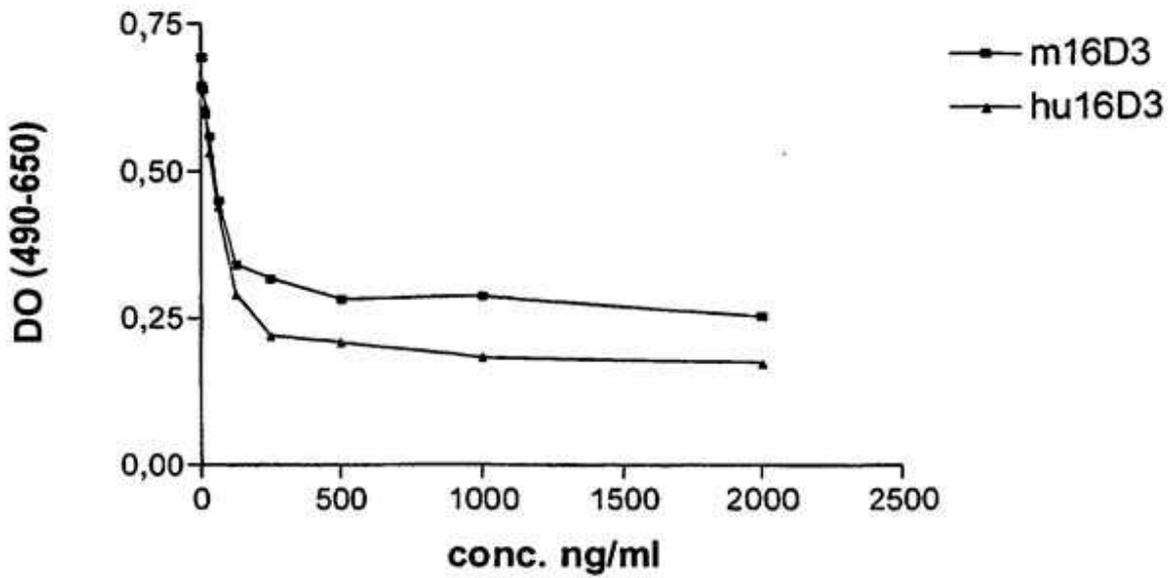


Figura 2

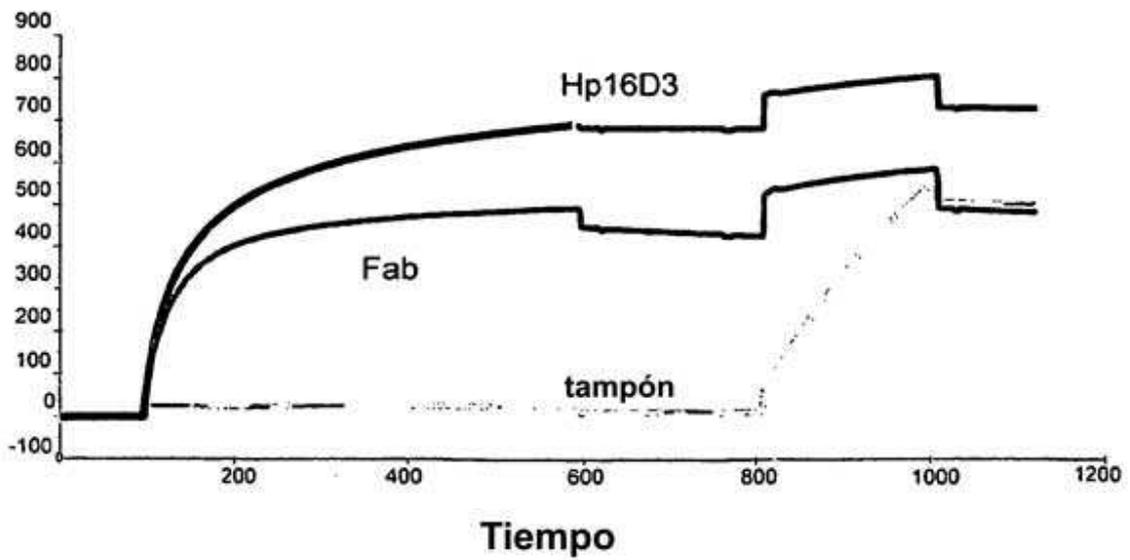
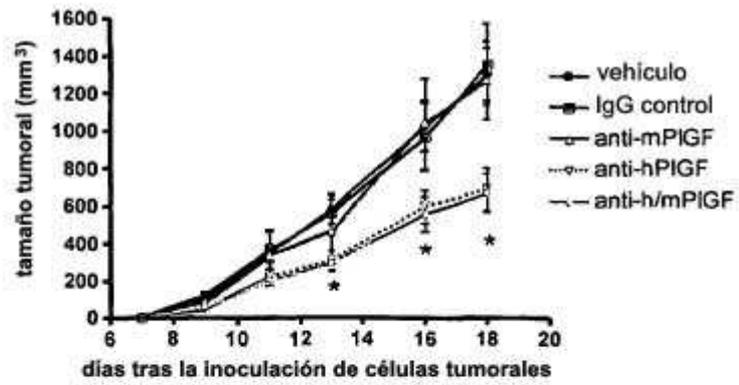


Figura 3

A



B

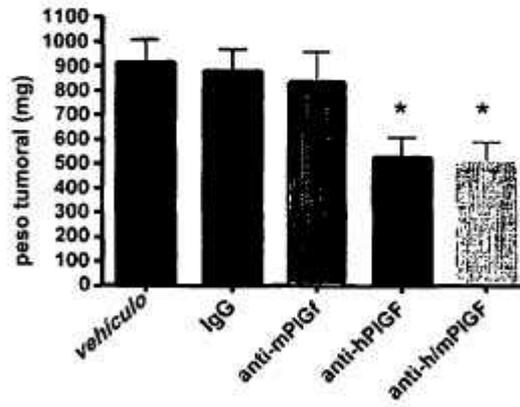
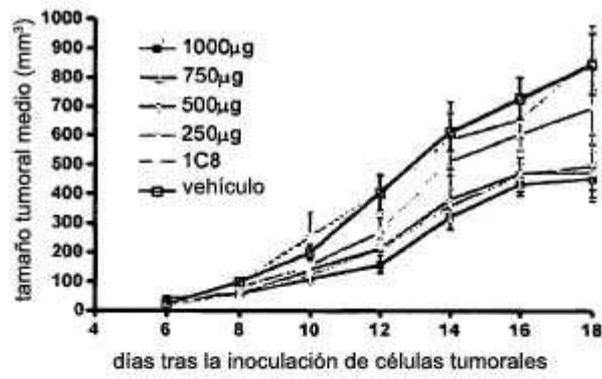


Figura 4

A



B

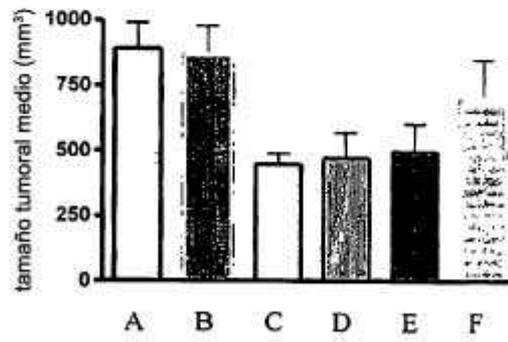
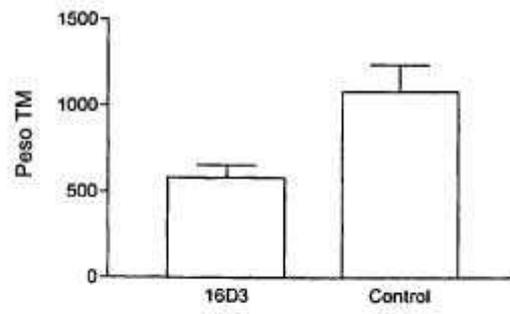


Figura 5

A



B

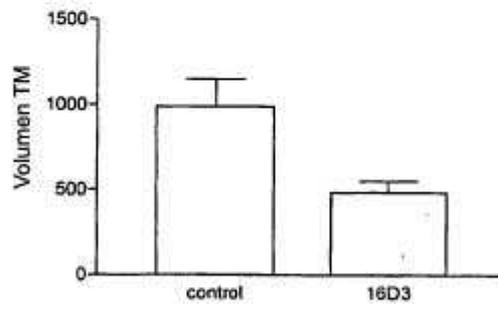
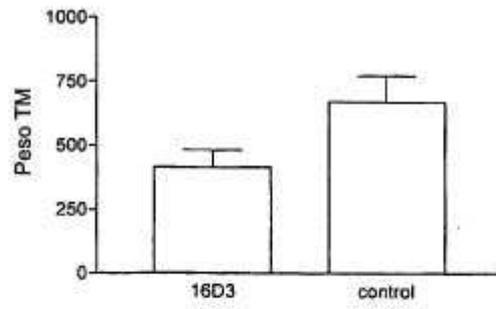


Figura 6

A



B

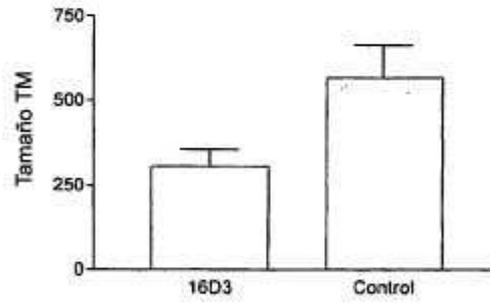


Figura 7

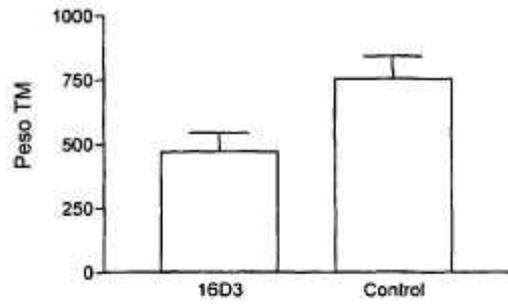


Figura 8

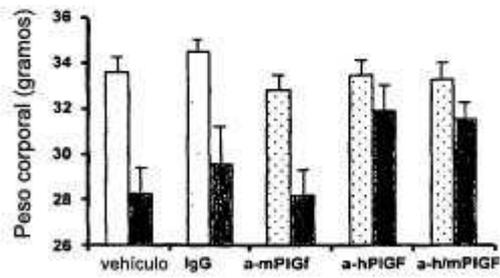


Figura 9

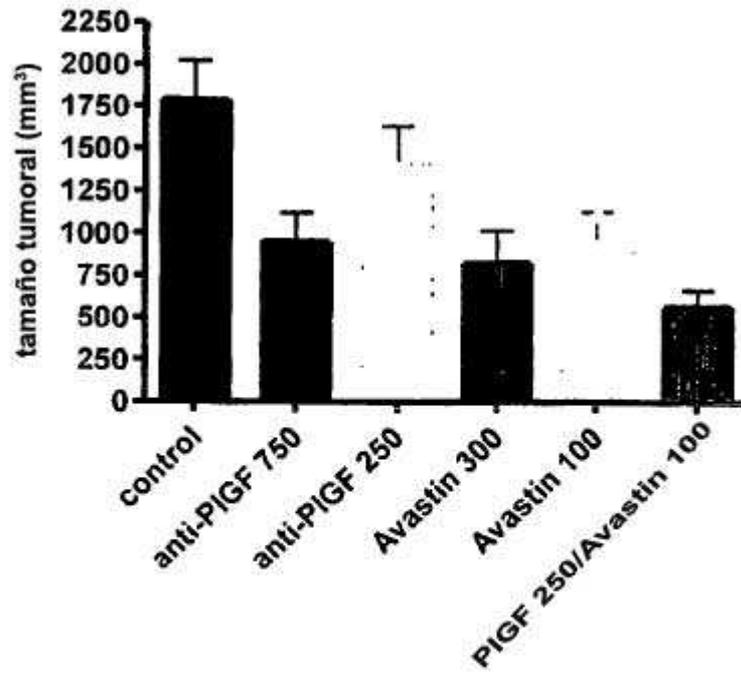


Figura 10

A: Secuencia de ADN de la parte variable de ratón de la cadena pesada (SEQ ID NO:1)

cagatccagctgcagcagctotggacctggagctggtgaagcctggggcttcagtgaaatatac
ctgcaaggcctctggctacaccttactgactactataaaaactgggtgaagttgaagcctg
gacagggacttgagtggattggatggatttatcctggaagcggtaataactaagtacaatgag
aagttcaagggcaaggccacattgactatagacacatcctccagcacagcctacatgcagct
cagcagcctgacatctgaggacactgctgtctatcttctgtgtaagagacagcccttctttg
actactggggccaaggcaccactctcacagtctcctca

B: Secuencia de ADN de la parte variable de ratón de la cadena ligera (SEQ ID NO: 3)

gacattgtgctgtcacagctctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactat
gcgctgcaaaatccagtcagagctctgctcaacagtggaatgcaaaagagtttctttggcttgg
accagcagaaaccagggcagctctcctaagctgctgatctactgggcatccactagggaaatct
gggtccctgatcgcttcacaggcagtggaatctgggacagatttactctcaccatcagcag
tgtgcaggctgaagacctggcagtttattactgcaagcaatcttatcatctattcacgttcg
gctcggggacaaagttggaaataaaa

C: Secuencia de AA de la parte variable de ratón de la cadena pesada (SEQ ID NO:2)

QI**Q**L**Q**Q**S**G**P**E**L****V****K****P****G****A****S****V****K****I****S****C****K****A****S****G****Y****T****F****T****D****Y****I****N****W****V****K****L****K****P****G****Q****G****L****E****W****I****G****W****I****Y****P****G****S****G****N**
T**K****Y****N****E****K****F****K****G****K****A****T****L****T****I****D****T****S****S****T****A****Y****M****Q****L****S****S****L****T****S****E****D****T****A****V****Y****F****C****V****R****D****S****P****F****F****D****Y****W****G****Q****G****T****T****L****T****V**
S**S**

D: Secuencia AA de la parte variable de ratón de la cadena ligera (SEQ ID NO: 4)

D**I****V****L****S****Q****S****P****S****S****L****A****V****S****A****G****E****K****V****T****M****R****C****K****S****S****Q****S****L****L****N****S****G****M****R****K****S****F****L****A****W****Y****Q****Q****K****P****G****Q****S****P****K****L****L****I****Y****W****A**
S**T****R****E****S****G****V****P****D****R****F****T****G****S****G****S****G****T****D****F****T****L****T****I****S****S****V****Q****A****E****D****L****A****V****Y****Y****C****K****Q****S****Y****H****L****F****T****F****G****S****G****T****K****L****E****I****K**

Figura 11

A. Secuencia de ADN de la parte variable humanizada de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5)

**cagggtccagctgcagcagctctggagccgagctgggtgaagcctggggcttcagtgaagatatac
ctgcaaggcctctggctacaccttcactgactactataataaactgggtgaagttggccctg
gacagggacttgagtggattggatggatttatcctggaagcggtaataactaagtacaatgag
aagttcaagggcaaggccacattgactatagacacatcctccagcacagcctacatgcagct
cagcagcctgacatctgaggacactgctgtctatttctgtgtaagagacagcccttctttg
actactggggccaaggcaccctgctcacagtctcctca**

B. Secuencia de ADN de la parte variable humanizada de la cadena ligera (SEQ ID NO: 7)

**gacattgtgctgaaccagctctccagactccctggctgtgtcactgggagagcgggtcactat
gaaactgcaaatccagtcagagctctgctcaacagtggaatgcgaaagagtttcttggcttggt
accagcagaaaccagggcagctctcctaagctgctgatctactgggcatccactagggaaatc
gggtccctgatcgcttcacaggcagtggaatctgggacagatttcactctcacatcagcag
tgtgcaggctgaagacgtcgagtttattactgcaagcaatcttatcatctattcacgttcg
gctcggggacaaagttggaaataaaa**

C. Secuencia de AA de la parte variable humanizada de la cadena pesada (SEQ ID NO: 6)

**QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGLLTV
SS**

D. Secuencia de AA de la parte variable humanizada de la cadena ligera (SEQ ID NO: 8)

**DIVLTQSPDLSLAVSLGERVTMNCSSQSLLN¹SGMRKSF²LAWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIK**

Figura 12

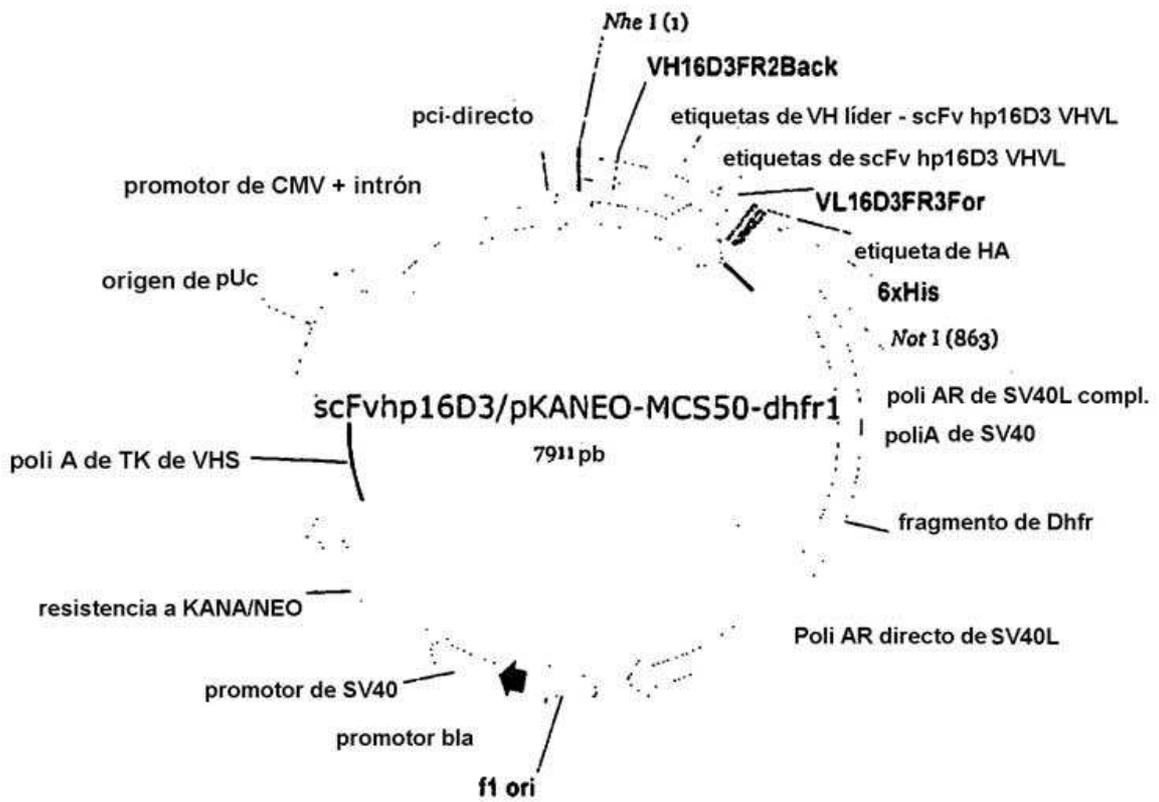
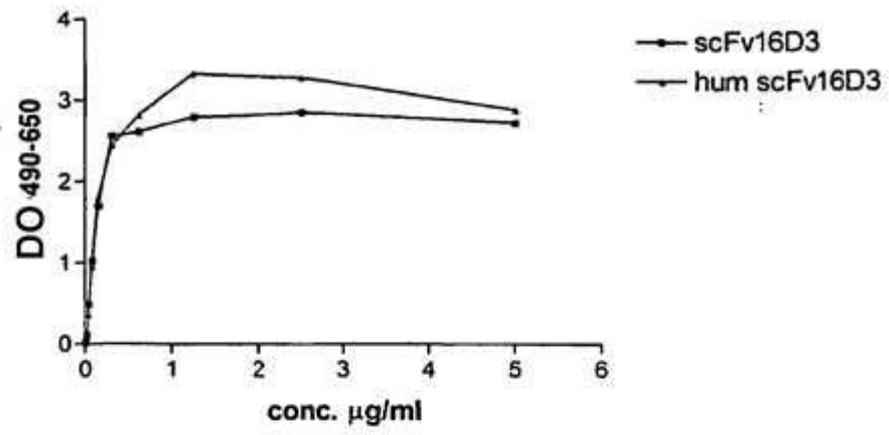


Figura 13

A



B

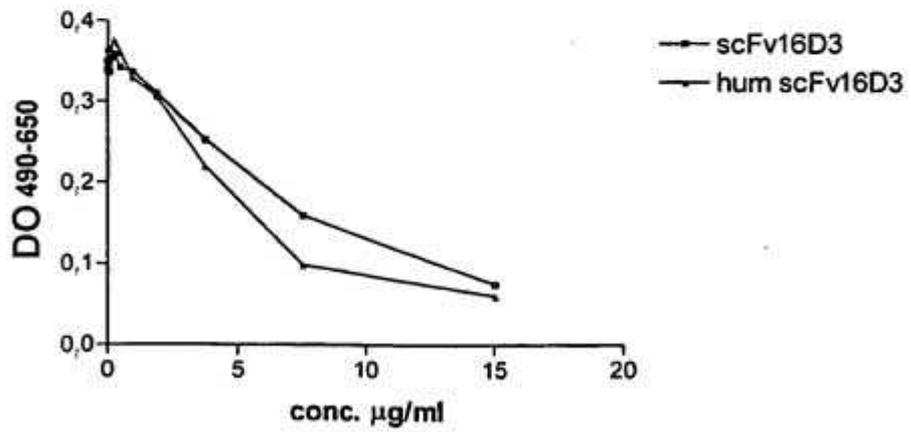


Figura 14

A

QIQLOQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYINWVKLK PGQGLEWIGW 50
 IYPGSGNTKY NEKFKGKATL TIDTSSSTAY MQLSSLTSED TAVYFCVRDS 100
 PFFDYWGQGT TLTVSSGGGG SGGGGSGGGG SDIVLSQSPS SLAVSAGEKV 150
 TMRCKSSQSL LNSGMRKSFL AWYQOKPGQS PKLLIWAST RESGVPDRFT 200
 GSGSGTDFTL TISSVQAEDL AVYYCKQSYH LFTFGSGTKL EIKGSYPYDV 250
PDYAGSHHHH HH

Cadena pesada :AA 1-116
 Secuencia de ligador :AA 117-131
 Cadena ligera :AA 132-243
 Etiqueta de HA :AA 246-254
 Etiqueta de His :AA 256-262

[SEQ ID No:24]

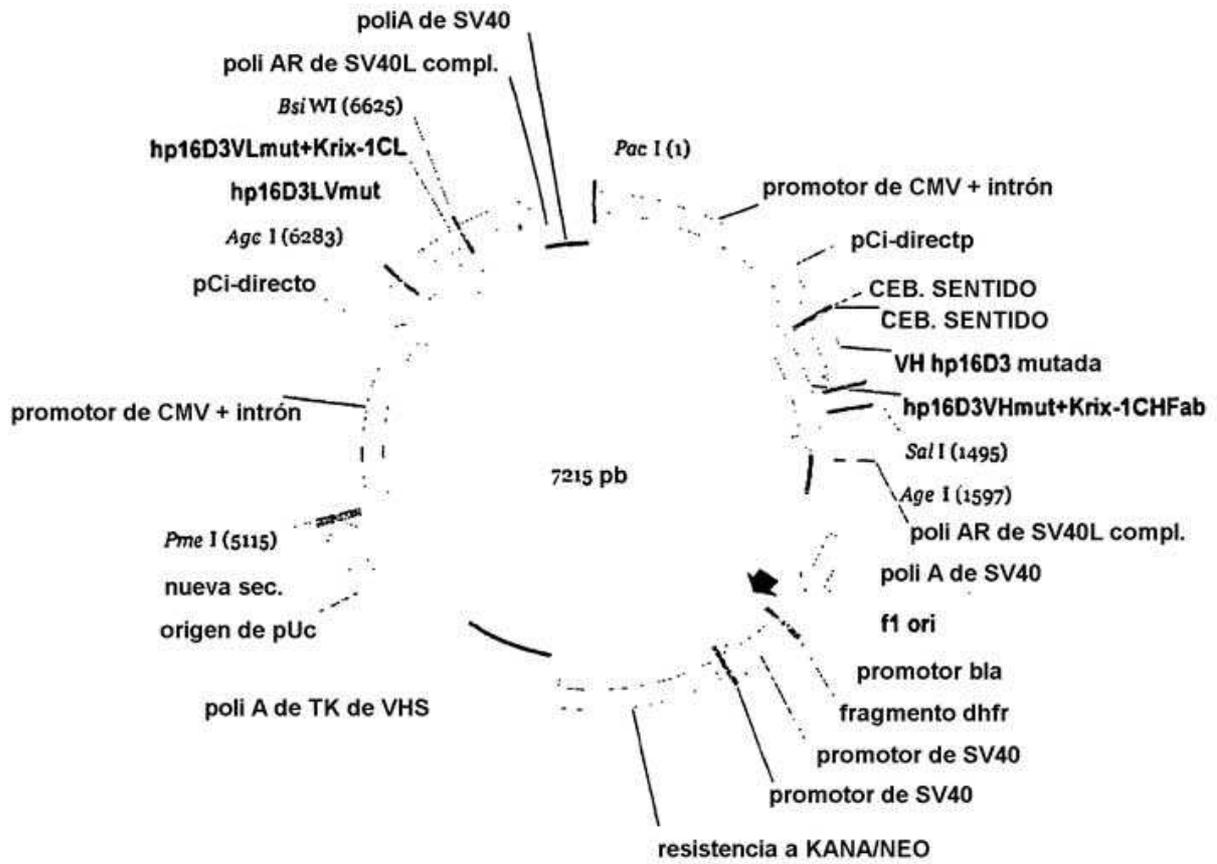
B

QVQLQQSGAE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYINWVKLA PGQGLEWIGW 50
 IYPGSGNTKY NEKFKGKATL TIDTSSSTAY MQLSSLTSED TAVYFCVRDS 100
 PFFDYWGQGT LLTVSSGGGG SGGGGSGGGG SDIVLTQSPD SLAVSLGERV 150
 TMNCKSSQSL LNSGMRKSFL AWYQOKPGQS PKLLIWAST RESGVPDRFT 200
 GSGSGTDFTL TISSVQAEDV AVYYCKQSYH LFTFGSGTKL EIKGSYPYDV 250
PDYAGSHHHH HH

Cadena pesada :AA 1-116
 Secuencia de ligador :AA 117-131
 Cadena ligera :AA 132-243
 Etiqueta de HA :AA 246-254
 Etiqueta de His :AA 256-262

[SEQ ID NO: 26]

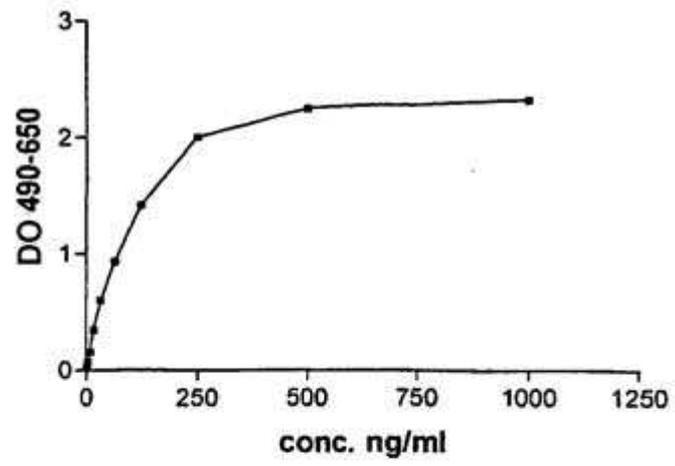
Figura 15



hp16D3mutcomplFab/pKANEO-MCS50-Fabvar sec. nueva n.º 3

Figura 16

A



B

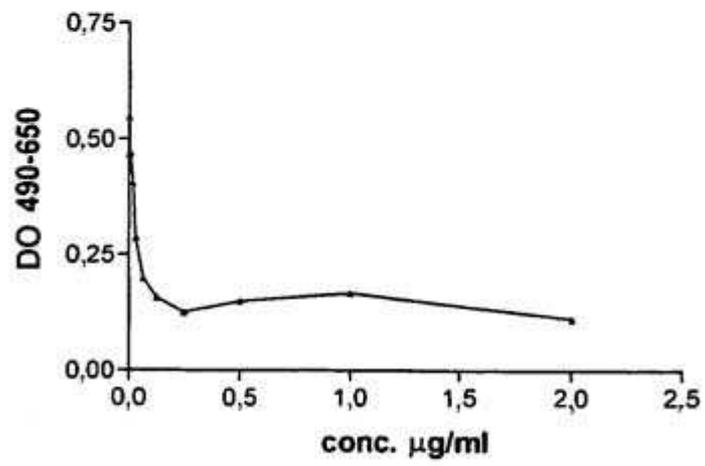


Figura 17