

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 881**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2008 E 08832515 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2203479**

54 Título: **Inhibición de la angiogénesis**

30 Prioridad:

21.09.2007 US 974382 P

23.07.2008 US 83071 P

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

05.05.2016

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

FERRARA, NAPOLEON;

SHOJAEI, FARBOD;

WU, XIUMIN y

ZHONG, CUILING

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 568 881 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

Inhibición de la angiogénesis

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la inhibición de la angiogénesis inflamatoria mediada por células. En particular, la invención se refiere a la prevención o el tratamiento de la angiogénesis tumoral, y a la inhibición del desarrollo tumoral, utilizando antagonistas de Bv8, tales como anticuerpos anti Bv8.

10

Antecedentes de la invención

Está bien establecido que la angiogénesis desempeña un papel importante en la evolución tumoral y la metástasis, y que la antiangiogénesis representa una estrategia antineoplásica clínicamente validada (Folkman, J., *Nat Med* 1, 27-31 (1995); Ferrara, N y Kerbel, R. S., *Nature* 438, 967-974 (2005); Carmeliet, P. *Nat Med* 9, 653-660 (2003)). La angiogénesis también desempeña un papel patológico clave en otros diversos trastornos, que incluyen degeneración macular senil (DMS). Se ha descrito que la neovascularización coroidea es dependiente, por lo menos en parte, de la infiltración de neutrófilos (Zhou *et al.*, *Mol Vis* 11: 414-424 (2005)). Tradicionalmente, se ha considerado a las células tumorales como la fuente principal de mediadores de la angiogénesis (Folkman, J., *N. Engl. J. Med* 385, 1182-1186 (1971)). De hecho, muchas de las investigaciones han demostrado que las células cancerosas pueden producir diversos factores angiogénicos, que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), angiopoyetinas, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y diversas mutaciones en oncogenes o genes supresores tumorales pueden dar como resultado la producción aumentada de por lo menos algunos de estos factores (Rak, J., *et al.*, *Cancer Res* 55, 4575-4580 (1995); Wizigmann, *et al.*, *Cancer Res* 55, 1358-1364 (1995)). Ahora, sin embargo, pruebas convincentes sustentan la idea de que el estroma, que consiste en fibroblastos, pericitos, células madre mesenquimales y células inmunoinflamatorias, y los progenitores endoteliales, también contribuyen al crecimiento tumoral no sólo a través de la secreción de factores angiogénicos sino también modulando el sistema inmunitario (Hanahan, D. y Weinberg, R. A., *Cell* 100, 57-70 (2000); Coussens, L. M. y Werb, Z., *Nature* 420, 860-867 (2002); Blankenstein T., *Curr Opin Immunol* 17: 180-186 (2005); Karnoub *et al.*, *Nature* 449: 557-563 (2005); Orimo *et al.*, *Cell Cycle* 5: 1497-1601 (2006); y Rafii, S. *et al.*, *Nat Rev Cancer* 2, 826-835 (2002)). Potencialmente, algunas de estas células pueden inhibir el crecimiento tumoral mediante mecanismos de vigilancia inmunitaria, pero gran parte de las pruebas indican que una infiltración acentuada de leucocitos y otras células inflamatorias en los tumores conlleva a un mal pronóstico (Coussens, *et al.*, citado anteriormente).

35

Estudios recientes han implicado de forma directa a distintas poblaciones de células mieloides en la regulación de la angiogénesis tumoral (Da Palma, M., *et al.*, *Nat Med* 9, 789-795 (2003); Yang, L. *et al.*, *Cancer Cell* 6, 409-421 (2004); De Palma M., *et al.*, *Cancer Cell* 8, 211-226 (2005)) y en la neovascularización inducida por VEGF en el adulto (Grunewald, M. *et al.*, *Cell* 124, 175-189 (2006)). Estudios muy recientes han proporcionado pruebas de un papel de las células mieloides CD11b+Gr1+ en la mediación de la insensibilidad a la terapia anti VEGF en algunos modelos tumorales (Shojaei, F. *et al.*, *Cell* 124, 175-189 (2006)). Se ha descrito el papel de los neutrófilos en el inicio del cambio angiogénico en un modelo transgénico de carcinogénesis de etapas múltiples (Nozawa, H. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12493-12498 (2006)). Las células mieloides pueden secretar de forma local factores angiogénicos o producir proteasas tales como la metaloproteínasa de matriz 9 (Yang, L., *et al.*, citado anteriormente; Nozawa *et al.*, citado anteriormente; van Kempen, L. C. *et al.*, *Eur J Cancer* 42, 728-734 (2006)), las cuales pueden a su vez promover la angiogénesis mediante el aumento de la biodisponibilidad y de la actividad de VEGF-A en el micro entorno tumoral (Bergers G., *et al.*, *Nat Cell Biol* 2, 737-744 (2000)). No obstante, nuestra comprensión de los mecanismos por los que las células mieloides se movilizan a partir de la MO y promueven la tumorigénesis todavía es incompleta.

40

Bv8 y EG-VEGF son dos proteínas secretadas altamente relacionadas, también denominadas como procinética 1 y 2, que estructuralmente pertenecen a una clase más grande de péptidos definidos por un motivo de cinco puentes disulfuro llamado pliegue colipasa (DeCouter, J. *et al.*, *Nature* 420, 860-867 (2002); LeCouter, J. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2685-2690 (2003); Li, M. *et al.*, *Mol Pharmacol* 59, 692-698 (2001)). De forma inicial se identificó a Bv8 como una proteína secretada de la piel de la rana *Bombina variegata* (Mollay, C. *et al.*, *Eur J Pharmacol* 374, 189-196 (1999)). La clonación y expresión de Bv8 se describe en el documento WO 03/020892, publicado el 13 de marzo de 2003. Bv8 y EG-VEGF se unen a dos receptores acoplados a proteína G altamente relacionados (GPCR), EG-VEGF/PCR-1 (R1) y EG-VEGF/PCR-2 (R2) (Masuda, Y *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 293, 496-402 (2002); Lin, D. C. *et al.*, *J Biol Chem* 277, 19276-19280 (2002)). EG-VEGF y Bv8 se caracterizaron como mitógenos selectivos para tipos celulares endoteliales específicos (LeCouter, J. *et al.*, (2001) and (2003), citado anteriormente). A esta familia se le han atribuido otras actividades, incluyendo nocicepción (Mollay, C. *et al.*, citado anteriormente), motilidad del tracto gastrointestinal (Li, M. *et al.*, citado anteriormente), regulación del ritmo locomotor circadiano (Cheng, MI, *et al.*, *Nature* 417, 405-410 (2002)) y neurogénesis del bulbo olfativo (Matsumoto, S., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4140-4145 (2006)). Además, Bv8 o EG-VEGF estimulan la producción de colonias granulocíticas y monocíticas *in vitro* (LeCouter, J. *et al.*, (2003), citado anteriormente; Dorsch, M. *et al.*, *J. Leukoc Biol* 78 (2), 426 - 34 (2005)). Se ha caracterizado a Bv8 como un quimioatrayente de macrófagos (LeCouter *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*

65

USA 101, 1681.3-16919 (2004)).

5 El reconocimiento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como un regulador principal de la angiogénesis en afecciones patológicas, ha conducido a numerosos intentos para bloquear las actividades de VEGF. VEGF es uno de los reguladores positivos de la angiogénesis mejor caracterizados y más potentes. Véase, por ejemplo, Ferrara, N. y Kerbel, R. S. *Angiogenesis as a therapeutic target*. *Nature* 438: 967-74 (2005). Además de ser un factor angiogénico en la angiogénesis y la vasculogénesis, VEGF, como factor de crecimiento pleiotrópico, muestra múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, tales como la supervivencia celular endotelial, la permeabilidad y la vasodilatación vascular, la quimiotaxis de monocitos y el flujo de entrada de calcio. Ferrara y Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18: 4-25. Además, los estudios han informado efectos mitogénicos de VEGF sobre unos pocos tipos celulares no endoteliales, tales como células epiteliales pigmentadas de la retina, células del conducto pancreático y células de Schwann. Véase, por ejemplo, Guerrin *et al.* *J. Cell Physiol.* 164: 385-394 (1995); Oberg-Welsh *et al.* *Mol. Cell. Endocrinol.* 126: 125-132 (1997); y, Sondell *et al.* *J. Neurosci.* 19: 5731-5740 (1999).

15 El reconocimiento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como un regulador principal de la angiogénesis en afecciones patológicas ha conducido a numerosos intentos para bloquear las actividades de VEGF. Los anticuerpos anti receptor de VEGF inhibidores, construcciones del receptor soluble, estrategias antisentido. Se han propuesto los aptámeros de ARN frente a VEGF y los inhibidores de la receptor tirosina quinasa de VEGF (RTK) de bajo peso molecular para su uso en la interferencia de la señalización de VEGF. Véase, por ejemplo, Siemeister *et al.* *Cancer Metastasis Rev.* 17: 241-248 (1998). Los anticuerpos neutralizantes anti VEGF han demostrado suprimir el crecimiento de diversas líneas celulares tumorales de ser humano en ratones desnudos (Kim *et al.* *Nature* 362: 841-844 (1993); Warren *et al.* *J. Clin. Invest.* 95: 1789-1797 (1995); Borgström *et al.* *Cancer Res.* 56: 4032-4039 (1996); y Melnyk *et al.* *Cancer Res.* 56: 921-924 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos de la retina isquémicos (Adamis *et al.* *Arch. Ophthalmol.* 114: 66-71 (1996)). De hecho, la US FDA ha aprobado a bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, South San Francisco, CA), un anticuerpo humanizado anti VEGF, en combinación con la quimioterapia intravenosa basada en 5-fluorouracilo (5-FU), para el tratamiento primario o secundario de pacientes con carcinoma metastásico de colon o de recto, y en combinación con carboplatino y paclitaxel para el tratamiento primario de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) no escamosas no extirpable, localmente avanzado, recurrente o metastásico. Véase, por ejemplo, Ferrara *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovers*, 3: 391-400 (2004).

35 Sin embargo, el desarrollo de resistencia a fármacos frecuentemente limita la capacidad prolongada de los compuestos terapéuticos para interferir con el crecimiento tumoral. Se han identificado y caracterizado funcionalmente varios mecanismos de resistencia a diversos componentes citotóxicos, principalmente en modelos de tumor unicelulares. Véase, por ejemplo, Longley, D. B. y Johnston, P. G. *Molecular mechanisms of drug resistance*. *J Pathol* 205: 275-92 (2005). Además, las interacciones de las células de tumor estromales del hospedador pueden estar implicadas en fenotipos resistentes a fármacos. Las células estromales secretan diversos factores proangiogénicos y no son propensas a la misma inestabilidad genética y a los aumentos de la tasa de mutación que las células tumorales (Kerbel, R. S. *Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti cancer therapeutic agents*. *Bioessays* 13: 31-6 (1991). Revisado por Ferrara y Kerbel, y Hazlehurst *et al.* en Ferrara, N. y Kerbel, R. S. *Angiogenesis as a therapeutic target*. *Nature* 438:967-74 (2005); y, Hazlehurst, L. A., Landowski, T. H. y Dalton, W. S. *Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death*. *Oncogene* 22: 7396-402 (2003).

45 En modelos preclínicos, el bloqueo de la señalización de VEGF con el anticuerpo monoclonal humanizado bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, South San Francisco, CA) o con el precursor murino de bevacizumab (A4.6.1 (línea celular de hibridoma que produce A4.6.1 depositado el 29/3/91, ATCC HB-10709)), inhibió de forma significativa el crecimiento tumoral y redujo la angiogénesis tumoral en la mayoría de los modelos de xenoinjerto analizados (revisado por Gerber y Ferrara en Gerber, H. P. y Ferrara, N. *Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies*. *Cancer Res* 65: 671-80 (2005)). Los efectos farmacológicos del tratamiento de agente único anti VEGF fueron más pronunciados cuando el tratamiento se inició en las fases tempranas del crecimiento tumoral. Si el tratamiento se retrasaba hasta que los tumores estaban bien establecidos, los efectos inhibidores normalmente eran transitorios, y los tumores finalmente desarrollaban resistencia. Véase, por ejemplo, Klement, G. *et al.* *Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts*. *Clin Cancer Res* 8: 221-32 (2002). Los acontecimientos celulares y moleculares que subyacen a tal resistencia al tratamiento anti VEGF son complejos. Véase, por ejemplo, Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G. y Hanahan, D. *Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors*. *Cancer Cell* 8: 299-309 (2005); y, Kerbel, R. S. *et al.* *Possible mechanisms of acquired resistance to anti angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches*. *Cancer Metastasis Rev* 20: 79-86 (2001). Puede estar implicada diversos factores. Por ejemplo, el tratamiento de combinación con compuestos que tienen como diana la señalización de VEGF y del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), mejoró la eficacia y retrasó la aparición de resistencia en tumores en etapas avanzadas en un modelo genético de carcinogénesis de islotes pancreáticos. Véase, Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G. y Hanahan, D. *Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors*. *Cancer Cell* 8, 299-309 (2005). Otros investigadores han identificado a los fibroblastos estromales infiltrantes el tumor como una fuente potente de

factores proangiogénicos alternativos. Véase, por ejemplo, Dong, J. *et al.* VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *Embo J* 23: 2800-10 (2004); y, Orimo, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-48 (2005).

5 Las células inflamatorias pueden participar en la angiogénesis mediante la secreción de citocinas inflamatorias, las cuales pueden afectar la activación, proliferación, migración, y supervivencia de las células endoteliales (revisado en Albini *et al.* y Balkwill *et al.* en Albini, A., Tosetti, F., Benelli, R. y Noonan, D. M. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 65: 10637-41 (2005); y, Balkwill, F., Charles, K. A. y Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7: 211-7 (2005). Varias células inflamatorias infiltrantes de tumor secretan factores proangiogénicos, incluyendo los monocitos/macrófagos (véase, por ejemplo, De Palma, M. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8: 211-26 (2005); y, Yang, L. *et al.* Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6: 409-21 (2004)), los linfocitos T y B (véase, por ejemplo, Freeman, M. R. *et al.* Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4140-5 (1995)), los leucocitos vasculares (véase, por ejemplo, Conejo-Garcia, J. R. *et al.* Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* 105: 679-81 (2005)), las células dendríticas (véase, por ejemplo, Conejo-Garcia, J. R. *et al.* Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med* 10: 950-8 (2004)), los neutrófilos (véase, por ejemplo, Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D. y Werb, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-90 (2000)), y los mastocitos (véase, por ejemplo, Coussens, L. M. *et al.* Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13: 382-97 (1999); y revisado en de Visser y Coussens en de Visser, K. E., Eichten, A. y Coussens, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6: 24-37 (2006)). Se sugirió que las células progenitoras endoteliales obtenidas de médula ósea (CPE (véase, por ejemplo, Lyden, D. *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-201 (2001)) y las células progenitoras perivasculares (véase, por ejemplo, Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z. y Bergers, G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* 7: 870-9 (2005)) contribuyen a la formación de vasos en algunos modelos experimentales de crecimiento tumoral (revisado en Rafii *et al.* en Rafii, S., Lyden, D. Benezra, R., Hattori, K. y Heissig, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2: 826-35 (2002)). Las células hematopoyéticas del linaje mielóide, incluyendo los macrófagos asociados a tumor (MAT), han mostrado estimular la angiogénesis de forma ya sea directa mediante la secreción de factores angiogénicos o indirecta mediante la producción de proteasas degradadoras de matriz extracelulares, las cuales a su vez liberan factores angiogénicos secuestrados (revisado en Lewis, C. E. y Pollard, J. W. Distinct role of macrophage in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 66: 605-612 (2006); y, Naldini, A. y Carraro, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 3-8 (2005)). Entre los linajes de células mieloides, las células progenitoras CD11b+Gr1+ aisladas de bazo de ratones que tienen tumor promovieron la angiogénesis cuando se coinyectaron con células tumorales (véase, por ejemplo, Yang, L. *et al.* Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6: 409-21 (2004)) y la cantidad de macrófagos infiltrantes de tumor se correlacionó con un mal pronóstico en algunos tumores de ser humano (revisado en Balkwill *et al.* en Balkwill, F., Charles, K. A. y Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7 (2005)). Sin embargo, en otro estudio los macrófagos inhibieron en ratones el crecimiento de tumores experimentales, sugiriendo su potencial como terapia antineoplásica. Véase, por ejemplo, Kohchi, C. *et al.* Utilization of macrophage in anticancer therapy: the macrophage network theory. *Anticancer Res* 24: 3311-20 (2004). Shojaei, F. Wu, *et al.* Tumor refractoriness to anti VEGF treatment is mediated by CD11b(+)/Gr1(+) myeloid cells. *Nat Biotechnology* 2007 25(8): 911-20, informó sobre el papel de las células mieloides CD11b(+)/Gr1(+) en la resistencia de tumores al tratamiento con anticuerpos anti VEGF. Hallazgos similares se divulgan en la Solicitud de Estados Unidos n.º de Serie 11/692681 en trámite junto con la presente, presentada el 28 de marzo de 2007.

A pesar de la abundancia relativa de las células mieloides y de su potencial para producir factores proangiogénicos, su papel en la resistencia del tumor al tratamiento anti VEGF continua siendo desconocida. Existe una necesidad por descubrir y comprender las funciones biológicas de las células mieloides, los tumores resistentes, y los factores que estos producen. La presente invención aborda estas y otras necesidades, como será obvio después de la revisión de la siguiente divulgación.

El documento WO 2004/081229 describe métodos de utilización de los polipéptidos y los ácidos nucleicos de Bv8 y EG-VEGF para promover la hematopoyesis, métodos de exploración de moduladores de la actividad de Bv8 y EG-VEGF y métodos de tratamiento que utilicen polipéptidos o antagonistas de Bv8 y EG-VEGF.

El documento WO 03/020892 describe métodos de utilización de polipéptidos Bv8 para inducir la proliferación de las células endoteliales y para potenciar la supervivencia de las células endoteliales, métodos de exploración de moduladores de la actividad de Bv8 y métodos de tratamiento que utilicen polipéptidos Bv8.

Sumario de la invención

5 La presente invención se basa, por lo menos en parte, en los datos experimentales que indican que Bv8 regula la movilización de las células CD11b+Gr1+ desde la médula ósea (MO) durante el desarrollo tumoral y promueve la angiogénesis tumoral. Por lo tanto, la presente invención proporciona tratamientos que utilizan anticuerpos anti Bv8 y anti VEGF, o fragmentos de los mismos, en pacientes humanos que previamente han sido tratados con un antagonista de VEGF, todo según se define en las reivindicaciones.

10 En una realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo anti VEGF puede, por ejemplo, ser bevacizumab o un fragmento o variante del mismo.

El antagonista de Bv8 es un anticuerpo monoclonal anti Bv8 o un fragmento del mismo. Bv8 al que el anticuerpo se une, es un polipéptido Bv8 de secuencia nativa del mamífero tratado.

15 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos, humanizados o humanos.

20 En el contexto de un anticuerpo anti VEGF, VEGF puede ser cualquier molécula VEGF, que incluye de forma específica, pero sin limitación, el factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos, y los factores de crecimiento celular endotelial vascular de 121, 145, 189, y 206 aminoácidos relacionados, junto con las formas alélicas de origen natural y la procesadas de los mismos.

En una realización particular, el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab o un fragmento o variante del mismo.

25 En otra realización, además de la administración de un antagonista de Bv8 y, de forma opcional, de un antagonista de VEGF, el sujeto mamífero, tal como un paciente humano, debe ser tratado con uno o más agentes de reducción de células mieloides adicionales, tal como un antagonista de Gr1, un inhibidor de la elastasa, un antagonista de MCP-1, y/o un antagonista de MIP-1 alfa.

30 En otra realización más el sujeto mamífero a tratar, tal como un sujeto humano, se somete a quimioterapia y/o terapia de radiación, en donde la quimioterapia puede, por ejemplo, comprender la administración de un agente citotóxico. Preferentemente, el tratamiento adicional es un tratamiento conocido como "tratamiento de referencia" para el tratamiento del tumor particular que se tiene como diana.

35 El tumor puede ser de cualquier tipo de tumor benigno o canceroso, que incluye, pero sin limitación, carcinoma que incluye adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. El cáncer preferente en el presente documento es cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de pulmón y cáncer de mama, en particular, carcinoma metastásico del colon o del recto, o cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) no escamosas.

40 En una realización particular, el tratamiento comprende adicionalmente la etapa de controlar la eficacia del tratamiento determinando el número y/o la frecuencia de las células CD11b+Gr1+ circulantes y/o de la médula ósea en una muestra biológica obtenida del sujeto mamífero, tal como un ser humano, en comparación con el número o frecuencia anterior al tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

45 En toda la descripción MO = médula ósea, y SP = sangre periférica.

Figura 1. Regulación de la expresión y la actividad de Bv8 en células de MO. a. Los tumores inducen la expresión de la proteína Bv8 en la MO. Se implantaron células tumorales A673 o HM7 en ratones desnudos beige. Un ELISA específico mostró niveles mayores ($p < 0,05$) de Bv8 en las CMMO (células mononucleares de médula ósea) de los ratones implantados con tumor y en comparación con los ratones implantados con Matrigel™ después de seis días. b. La expresión de Bv8 está específicamente regulada de forma positiva en el subconjunto CD11b-Gr1+ de las células de MO. Se implantaron células A673, HM7, HPAC, Calu-6 y Jurkat en ratones desnudos beige. Después de 10 días, se aislaron de la MO de los ratones las células mieloides CD11b+Gr1+ y se determinó el análisis Taqman™ mediante la expresión de Bv8 en los subconjuntos mioide y no mioide (CD11b-Gr1-) por. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se compara en cada tumor CD11b+Gr1+ contra la población CD11b-Gr1- correspondiente. c. G-CSF es un inductor principal de la expresión de Bv8. Se aislaron CMMO de ratones sin tratamiento previo y se incubaron con un grupo de citocinas y quimiocinas, y la expresión de Bv8 se evaluó mediante Taqman™, como se describe en los Métodos. d. G-CSF es el inductor principal de Bv8 en las células CD11b+Gr1+. Se aislaron CMMO de ratones Balb-c y se clasificaron en los subconjuntos CD11b+Gr1+ y CD11b-Gr1- mediante FACS. Se trataron las poblaciones de MO completa, CD11b+Gr1+ y CD11b-Gr1- con SDF1 α , G-CSF y GM-CSF, como se describe en los Métodos. e. La hipoxia potencia la regulación positiva de Bv8 mediante G-CSF en células mieloides. Se incubaron CD1b+Gr1+ de MO con G-CSF a 20 o 2500 pg/ml en condiciones normóxicas o hipóxicas (O₂ al 1 %) durante 4 horas. f. Los niveles de Bv8 aumentan de forma significativa en la MO después de la inyección de G-CSF. Se inyectaron ratones Balb-c s.c. con G-CSF en el día 0 y después diariamente durante 8 días. Se tomaron muestras de MO en los días 1, 3, 6 y 8 y se midieron los niveles de proteína Bv8 como

se describe. **g.** El tratamiento con anti G-CSF inhibe la regulación positiva de Bv8 que induce G-CSF. Se incubaron CMMO recién aisladas con lisado de tumor HM7 y diversas concentraciones de anti G-CSF, como se indica. Se controló la expresión de Bv8 en las CMMO mediante Taqman™. **h.** Anti G-CSF reduce los niveles de Bv8 en la MO de ratones que no tienen tumor. Ratones desnudos Balb/c se trataron con PBS, IgG de control y anti G-CSF, y se midieron mediante ELISA los niveles de Bv8 en las CMMO como se describe en los Métodos. **i.** Anti G-CSF reduce el nivel de Bv8 en la MO de ratones que tienen tumor HM7. Para detalles véanse los Métodos. Después de cuarenta y ocho horas después del implante del tumor o de Matrigel™, se midieron los niveles de proteína Bv8 en las CMMO como se describe. **j.** Bv8 desempeña un papel en la movilización de neutrófilos que induce G-CSF. Se trataron ratones desnudos Balb/c i.p. con varios agentes que incluían anti G-CSF, anti Bv8, Acm de control y anticuerpo IgG de control, dos veces en 12 horas, como se describe en los Métodos. 6 horas después de la inyección final se extrajo sangre de todos los ratones y se determinó la frecuencia de células CD1b+Gr1+ en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), como se describe.

Figura 2. Efectos de los anticuerpos anti Bv8 sobre el crecimiento de las líneas celulares tumorales trasplantadas en ratones desnudos. Se implantaron células tumorales A673 (a), HM7 (b), HPAC (c) y Jurkat (d) en ratones desnudos Balb-c como se describe en el texto. El tratamiento con los Acm de control (anti ambrosía), anti Bv8 o anti VEGF-A (n = 10) se inició 24-48 horas después de la inoculación de las células tumorales. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana. El peso tumoral se determinó al final del experimento. Los datos mostrados son las medias ± ETM. Los asteriscos indican la diferencia significativa en anti BV8 o anti VEGF en comparación con los grupos tratados de control ($p < 0,05$). **e.** Anti Bv8 y anti VEGF tienen efectos aditivos para inhibir el crecimiento tumoral en los tumores resistentes a anti VEGF. Se implantaron células TIB42 en ratones desnudos beige y se trataron con anticuerpos de control, anti BV8, anti VEGF y anti BV8 más anti VEGF. El recuadro muestra los pesos tumorales terminales en los cuatro tratamientos. C: control, AV: anti VEGF, AB: anti Bv8.

Figura 3. El tratamiento anti Bv8 reduce las células CD11b+Gr1+ en la SP y en tumores en varios modelos. a y b. Se implantaron células A673, Calu6, HM7, HPAC y Jurkat en ratones desnudos (n = 5). Después, los ratones se trataron con Acm anti Bv8 o de control como se describe en los Métodos. Se realizó el análisis diez días después del implante del tumor y la frecuencia de las células CD11b+, Gr1+ y CD11b+Gr1+ en SP (a) y en los tumores (b) se midió como se describe. El recuadro en la parte a muestra la frecuencia de las células CD11b+, Gr1+ y CD1b+Gr1+ en los ratones con Matrigel™. **c y d.** La inyección intratumoral de CDR11b+Gr1+ de MO puede anular la inhibición del crecimiento tumoral mediante el tratamiento anti BV8. Se implantaron ratones desnudos con tumores A673 (c) y HM7 (d) y se trataron con los Acm anti Bv8 o de control. En el día 7 (indicado mediante flechas), se aislaron las células CD1b+Gr1+ de la MO de los ratones tratados previamente con los tumores A673 y HM7 utilizando esferas de CD11b+. La población purificada se inyectó de forma directa en los ratones que tenían tumor y el tratamiento se continuó como se describe.

Figura 4. Bv8 regula la angiogénesis tumoral. Se implantaron 5×10^6 células HM7 en ratones inmunodeficientes como se describe. Cinco días después del implante, los ratones se inyectaron con 10^7 ufp de Av-Bv8, Av-VEGF o Av-LacZ. **a.** La medición del volumen tumoral terminal en todos los tratamientos indicó una diferencia significativa en el volumen tumoral en Av-Bv8 y Av-VEGF en comparación con los tumores de Av-lacZ. **b.** La frecuencia de las células CD1b+Gr1+ en la sangre periférica (SP) fue mayor en los ratones tratados con Av-Bv8 en comparación con los animales Av-VEGF y Av-LacZ. **c y d.** Los análisis de Tmicro-C revelaron un volumen vascular aumentado (c) en ratones que se inyectaron con Bv8-adenovirus y VEGF-adenovirus en comparación con los ratones inyectados con LacZ. **e.** Se muestra una imagen representativa de los tumores en los que se inyectó Av-LacZ, Av-VEGF y Av-Bv8. Las redes vasculares y los tumores se muestran en rojo y gris, respectivamente. **f.** El tratamiento con Acm anti Bv8 inhibe el crecimiento tumoral afectando la vasculatura tumoral. Se implantaron ratones desnudos con células HM7 y se trataron con anticuerpo anti Bv8, anti VEGF o de control. En consistencia con los datos de la Figura 2b, los tratamientos anti Bv8 y anti VEGF dieron como resultado la inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con el control. **g.** El tratamiento anti Bv8 reduce la frecuencia de CD1b+Gr1+ circulantes en la MO en comparación con anti VEGF y el control. **h e i.** La estrategia Tmicro-C, descrita anteriormente, mostró una disminución significativa del volumen vascular (**h**) y de la densidad vascular (**i**) en los ratones tratados con anti Bv8 contra los tratados de control. El grado de inhibición es similar al que proporcionó el tratamiento anti VEGF. **j.** Se muestran los datos angiográficos de Tmicro-C representativos para los tratamientos anti Bv8, anti VEGF y de control. Las redes vasculares y los tumores se muestran en rojo y gris, respectivamente.

Figura 5. El tratamiento anti VEGF induce la expresión de Bv8. a-d. Se implantaron ratones con células HM7 y se trataron con Acm anti VEGF o de control, como se describe. Se midieron las concentraciones de la proteína Bv8 en la MO (a), SP (b), bazo (c) y los tumores (d) en los días 1, 3, 6, 9, 12 y 15 después del implante del tumor. Todos los experimentos se realizaron en paralelo con ratones implantados con Matrigel™ y sin tratamiento previo. **e.** Datos de IHQ para confirmar adicionalmente la infiltración de neutrófilos en los animales implantados con A673 y HM7. Secciones fijadas con formalina proporcionadas por los ratones que tenían A673 o HM7 y tratados con anticuerpos de control, anti Bv8 o anti VEGF durante 15 días. Las secciones se tiñeron con anticuerpo anti Gr1 como se describe en los "métodos". **f.** Las células CD11b+ son la fuente principal de Bv8 en los tumores. Se implantaron ratones desnudos beige con células A673, Calu-6, HM7, HPAC y Jurkat y se les realizó la eutanasia en el día 10 después del trasplante de las células tumorales. Se aislaron las poblaciones de células enriquecidas en CD11b+ utilizando microesferas CD11b, como se describe. Se analizó la expresión de Bv8 utilizando cebadores de Taqman™

específicos para transcritos de Bv8 de ratón. Los datos se normalizaron utilizando GAPDH de ratón.

Figura 6. Anti Bv8 tiene efectos aditivos con anti VEGF o con la quimioterapia citotóxica. a y b. El tratamiento anti Bv8 es en la mayoría de los casos más eficaz cuando el tratamiento se inicia temprano en el desarrollo tumoral. Se implantaron ratones desnudos con tumores HM7 (a) y A673 (b) y no recibieron ningún tratamiento hasta que los tumores alcanzaron ~ 400 mm³. Después se trataron los ratones con los anticuerpos de control, anti BV8, anti VEGF o combinación (anti VEGF más anti Bv8). El volumen tumoral se midió como se describe. * indica la diferencia significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral de la terapia de combinación contra la monoterapia anti VEGF. **c y d.** Anti Bv8 tiene un efecto aditivo en tumores resistentes a anti VEGF cuando se utiliza en combinación con anti VEGF. Se implantaron células EL4 en ratones desnudos (c) y C57B1/6 (d) y se sometieron al tratamiento con el control, anti Bv8, anti VEGF o la combinación. Se midió el volumen tumoral y el peso tumoral terminal como se describe. * indica la diferencia significativa ($p < 0,5$) del volumen tumoral en el control contra cada monoterapia o la terapia de combinación. Las diferencias del volumen tumoral son también significativas cuando se compara la combinación contra cada monoterapia. **e.** El tratamiento con cisplatino y anti VEGF aumenta la concentración de Bv8 en el suero. Se implantaron células A673 en ratones desnudos beige, y se trataron con PBS, cisplatino (5 mg/kg) más anticuerpo de control, cisplatino más anti Bv8, o cisplatino más anti VEGF o la combinación cisplatino, anti Bv8 y anti VEGF. Mediante ELISA se midieron las concentraciones en suero de la proteína Bv8. **f.** La quimioterapia más anti VEGF y anti Bv8 puede suprimir de forma eficaz el crecimiento tumoral en tumores A673 establecidos. Se inyectaron células A673 en ratones desnudos beige y recibieron los tratamientos, como se menciona anteriormente, 13 días después del implante de las células tumorales. * indica la diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las terapias de combinación contra cisplatino más control.

Figura 7. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de un ADNc que codifica un homólogo de Bv8 de ser humano. También se presentan en negrita y subrayadas las posiciones de los codones de iniciación y de terminación respectivos.

Figura 8. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de un polipéptido homólogo de Bv8 de ser humano como se obtiene de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1. Está comprendida en los aminoácidos 1 a 21 una secuencia señal supuesta.

Figura 9. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) de un ADNc que codifica una versión cortada y empalmada alternativa del homólogo de Bv8 de ser humano. También se presentan en negrita y subrayadas las posiciones de los respectivos codones de iniciación y de terminación.

Figura 10. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un polipéptido homólogo de Bv8 de ser humano como se obtiene de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 3.

Figura 11. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de un homólogo de Bv8 de ratón. También se presentan en negrita y subrayadas las posiciones de los respectivos codones de iniciación y de terminación.

Figura 12. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de un polipéptido homólogo de Bv8 de ratón como se obtiene de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 5.

Figura 13. Alineamiento de los homólogos de Bv8 de ratón (SEQ ID NO: 37) y de ser humano (SEQ ID NO: 2). Está recuadrado un dominio de unión a heparina potencial. Como se indica, este dominio no está presente en un transcrito cortado y empalmado de forma alternativa. Los homólogos de Bv8 de ratón y de ser humano son aproximadamente el 96 % idénticos.

Figura 14. Regulación de la expresión de Bv8 *in vitro* utilizando células sanguíneas de ser humano purificadas y células de médula ósea recién obtenidas. Se trataron las células con diversas citocinas o quimiocinas a 10 ng/ml durante 4 horas antes de someterlas a extracción de ARN y al análisis de Taqman para la expresión Bv8. Todos los datos se normalizaron adicionalmente frente al gen RPL 19 de control interno como cambio en veces, con la muestra no tratada como 1. Se utilizaron para el estudio 20 donantes humanos distintos sin medicación, como se describe en los Materiales y Métodos. Se muestran a la derecha una imagen representativa de las células purificadas y sus expresiones de marcadores mediante FACS. (A) Células de médula ósea recién obtenidas, (B) neutrófilos (C), monocitos, (D) linfocitos *** $p < 0,01$ contra control no tratado.

Figura 15. Regulación de la expresión del receptor de Bv8 PKR2/EG-VEGFR2 por diversas citocinas relacionadas con G-CSF en células de médula ósea y neutrófilos de ser humano. (A) Neutrófilos o (B) células de médula ósea recién aislados se trataron con diversas citocinas relacionadas con G-CSF. Después de 4 horas de incubación *in vitro*, las células se recogieron y se extrajo el ARN para la expresión de PKR2/EG-VEGFR2 mediante Taqman. Para la normalización se utilizó RPL19 como el gen de control interno. Los experimentos se hicieron utilizando 3 donantes sanos independientes. Se muestra la respuesta a las citocinas de cada donante individual y después se representa en los paneles insertados el nivel de expresión promedio de los 3 donantes. *** $p < 0,01$ contra el control no tratado.

Figura 16. Bv8 y PKR2/EG-VEGFR2 se regulan de forma positiva en células mononucleares de donantes tratados con G-CSF. Leucocitos de individuos tratados con G-CSF (n=12) y no tratados (n=11) (sin emparejamiento) se lavaron brevemente y se sedimentaron antes de la extracción de ARN o del tratamiento de lisis en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteinasas. Se realizaron el análisis de Taqman de la expresión de Bv8 (A), de PKR2/EG-VEGFR2 (C) y el ELISA de Bv8 de ser humano específica (B). Los datos se normalizaron frente a la expresión de RPL19 para el Taqman y la concentración de proteína total para ELISA. ***p<0,01 contra el control no tratado.

Figura 17. Caracterización de la proteína Bv8 que producen los neutrófilos de ser humano. (A) Se aislaron neutrófilos de ser humano y se sometieron al tratamiento de lisis como se describe en los Materiales y Métodos. El lisado se aplicó a heparina-Sepharosa como se describe. Las fracciones 9, 10 y 11, eluidas en presencia de NaCl ~0,4 M, tenían los mayores niveles de Bv8. Los datos mostrados aquí eran representativos de 3 aislamientos independientes. (B) Actividad biológica de Bv8 de ser humano purificada de neutrófilos de ser humano. Se utilizaron células GeneBLazer NFAT-CHO transfectadas con PKR1/EG-VEGFR1 para detectar la activación inducida por Bv8 de la ruta de señalización del receptor acoplado a proteína G aguas abajo. Se utilizó Bv8 de ser humano recombinante a 20 ng/ml para que sirva como un control positivo y se utilizó como un control negativo VEGF de ser humano a 200 ng/ml. Los datos se normalizaron adicionalmente como cambio de veces, con los pocillos no tratados siendo 1. *** p<0,01 contra el control no tratado o de tampón. Se realizaron tres estudios independientes.

Figura 18. Migración de neutrófilos en respuesta a Bv8. Se pusieron 10⁶ neutrófilos resuspendidos en HBSS que contenía BSA al 0,2 % en insertos de transpocillos con tamaño de poro de 5 µm. Se añadió a la cámara inferior medio solo o medio con Bv8 de ser humano recombinante purificada (0,2 pM-20 nM) u otros factores quimiotácticos conocidos, tales como SDF-1α, a diversas concentraciones (hasta 20 nM). Después de 3 horas a 37 °C, se contaron las células de la cámara inferior y los datos se normalizaron adicionalmente como aumentos en veces, con las muestras no tratadas siendo 1. Los experimentos se realizaron en 6 donantes sanos.

Figura complementaria 1. Caracterización de la proteína Bv8 que producen las CMMO. a. Se aislaron células mononucleares obtenidas de médula ósea (CMMO) de ratón y se sometieron a tratamiento de lisis como se describe en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 1. El lisado se aplicó a una columna de heparina-Sepharosa™ preequilibrada en Tris 20 mM pH 7,2, NaCl 50 mM. La columna se eluyó con un gradiente de NaCl como se describe en los Materiales y Métodos. Las concentraciones de Bv8 en cada fracción se midieron por ELISA. Las fracciones 13 y 14, eluidas en presencia de aproximadamente NaCl 0,4 M, tenían los mayores niveles de Bv8. b. De acuerdo con los datos del ELISA, los análisis de transferencia de Western muestran que Bv8 está altamente enriquecida en las fracciones 13 y 14.

Figura complementaria 2. G-CSF es un regulador clave de la expresión de Bv8 en ratones normales y en ratones que tienen tumor. a. Los niveles de Bv8 aumentan de forma significativa en el suero después de la inyección de G-CSF. El día 0 se inyectó G-CSF i.p. en ratones desnudos Balb-c y después diariamente durante 8 días. Se tomaron muestras en los días 1, 3, 6 y 8. b. El recuento de neutrófilos del experimento anterior mostró un aumento en el número de neutrófilos circulantes en los ratones tratados con G-CSF. c y d. Se trataron con PBS, IgG de control y anti G-CSF, ratones desnudos Balb-c, durante 8 días consecutivos y se determinó la frecuencia de las células CD11b+Gr1+ en sangre periférica (SP) (c) y MO (d) utilizando tinción de FACS, como se describe. e y f. Se pretrataron ratones desnudos Balb/c con anticuerpos anti G-CSF o IgG de control 12 horas antes del implante de tumor/Matrigel™. Los ratones que tenían Matrigel™ y tumor se trataron con anti G-CSF o IgG de control durante dos días consecutivos. En el análisis terminal, se investigó la frecuencia de CD11b+Gr1+ en SP (e) y en MO (f) utilizando FACS.

Figura complementaria 3. a. Bv8 induce la migración transpocillos de células mieloides CD11b+Gr1+. Los controles fueron PBS o medio solo. b y c. Expresión de los receptores de Bv8 en las CMMO. Se implantaron células A673, HM7, HPAC o Calu-06 en ratones desnudos beige, como se describe. Después de 10 días, se aislaron células mieloides CD11b+Gr1+ de la SP y se realizaron análisis de Taqman™ para investigar la expresión de los EG-VEGFR en los subconjuntos mieloides y no mieloides (CD11b-Gr1-) de ratones implantados con tumor contra implantados con Matrigel™. Tales análisis revelan mayor expresión en las CMMO de EG-VEGF/PK-R2 (c) que de EG-VEGF/PK-R1 (b). d. Bv8 altera el destino de la población progenitora de células mieloides (CD11b+Gr1+) y también inhibe la muerte celular en la población Lin-. La fracción Lin-, aislada de las CMMO de ratones desnudos beige, se incubó con Bv8 durante 5 días y se evaluó la frecuencia de células CD11b+Gr1+ en una máquina hACSCalibur. Además, se empleó tinción 7AAD para medir el número de células muertas en cada tratamiento. e. Bv8 induce la capacidad clonogénica de las células progenitoras. La población Lin- se trató con Bv8 o con PBS durante 5 días y se sembró en placa sobre metilcelulosa (7500 células por placa) y se incubó en CO₂ al 5 % y 37 °C durante 15 días. Los recuentos de colonias diferencial y total revelaron una mayor capacidad clonogénica de las células tratadas con Bv8. f. Bv8 es un factor de supervivencia para las poblaciones mieloides. Las células CD11b+Gr1+, aisladas de las CMMO de ratones beige/desnudos, se cultivaron en medio y se trataron con Bv8 (300 ng/ml) durante 5 días. Se midió la muerte celular en una máquina FACSCalibur utilizando tinción 7AAD. g y h. La interrupción del tratamiento anti Bv8 dio como resultado el rápido crecimiento tumoral. Se implantaron tumores A673 (e) o HM7 (f) en ratones, y se trataron con anticuerpos anti Bv8 o de control como se describe. El tratamiento se finalizó el día 7 después del implante, como se indica mediante flechas en la figura. i y j. El tratamiento

interrumpido de anti Bv8 dio como resultado el repunte de las células CD11b+Gr1+ para los tumores A673 (i) y HM7 (j).

5 **Figura complementaria 4. Efectos de los anticuerpos anti Bv8 sobre la hematopoyesis en ratones que no tienen tumor.** Ratones desnudos Balb/c se trataron con PBS, anticuerpo de control o anticuerpos anti Bv8 a la dosis terapéutica durante 3 semanas. Se analizaron en la MO (c), bazo (d) y SP (e), los pesos corporales (a), pesos de órganos (b), y también los linajes celulares mieloides y linfoides

10 **Figura complementaria 5. El tratamiento con anticuerpos anti Bv8 reduce el número de células CD11b+Gr1+ en la SP y en tumores en el modelo de A673.** Se implantaron 5×10^6 células A673 en ratones beige/desnudos y recibieron tratamiento anti Bv8, comenzando 48 horas después del implante, y a partir de entonces dos veces por semana. Se controlaron en los ratones tratados con anti Bv8 y de control, las cinéticas de las células CD11b+ (datos no mostrados), Gr1+ (datos no mostrados) y CD11b+Gr1+ en distintos momentos (es decir días 5, 10, 19 y 29 después del implante). a. Las CMMO se aislaron de cada grupo de tratamiento y se sometieron al procedimiento de tinción como se describe en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 1. b. Se extrajo sangre de los ratones en cada punto de tiempo y se midió la frecuencia de CD11b+Gr1+ utilizando un FACSCalibur. c. Las células tumorales se recontaron de forma individual y las cantidades de células CD11b+Gr1+ se calcularon multiplicando la frecuencia de estas células por el número total de células tumorales. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada momento cuando se comparan los ratones tratados con anti Bv8 contra la correspondiente población tratada de control.

25 **Figura complementaria 6. Perfiles de FACS representativos de poblaciones de células CD11b, Gr1 y CD11b+Gr1+ en ratones que tenían tumor.** Se implantaron 5×10^6 células A673, Calu6, HM7, HPAC o Jurkat en ratones beige desnudos ($n=5$). Los ratones se trataron con Acm anti Bv8 o de control como se describe en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 1. Los ratones se analizaron en el día 10 después del implante del tumor y se midió la frecuencia de las células CD11b+, Gr1+, y CD11b+Gr1+ en MO, SP, tumores y bazos, como se describe.

30 **Figura complementaria 7. El implante de tumor aumenta la frecuencia de CD11b+Gr1+ en la MO y el bazo.** Se implantaron 5×10^6 células A673, Calu6, HM7, HPAC o Jurkat en ratones beige desnudos ($n=5$). Los ratones se trataron con Acm anti Bv8 de control como se describe en los Materiales y Métodos, y después se aislaron células de MO o del bazo de los ratones que tenían tumor, y se tiñeron con anti G11 y anti CD11b. Los gráficos representan el porcentaje de células CD11b+, Gr1+, y CD11b+Gr1+ en la MO (a) y el bazo (b). El recuadro en la parte superior derecha muestra la frecuencia de células CD11b+, Gr1+ y CD11b+Gr1+ en ratones implantados con Matrigel™. c. El tratamiento anti Bv8 reduce la capacidad clonogénica de las CMMO y los esplenocitos. Se implantaron células A673 y HM7 en ratones desnudos y después se trataron con anticuerpos anti Bv8 o de control como se describe. Las CMMO y los esplenocitos se recolectaron de los ratones que tenían tumor 10 días después del implante del tumor, y se sembraron para el ensayo CPU.

40 **Figura complementaria 8. Bv8 promueve la formación de conductos en CEAT (células endoteliales asociadas a tumor) y no logra estimular el crecimiento de células tumorales.** a. Bv8 induce la formación de conductos en células endoteliales *in vitro*. Se sembraron las CEAT en placas recubiertas con Matrigel™ y después se incubaron con medio basal (control), Bv8 o VEGF-A, con o sin anti Bv8, como se describe en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 1). Las imágenes (contraste de fase; aumento original de 20X) muestran el aspecto de los conductos endoteliales después de la incubación durante 36 horas. b. La CEAT expresan marcadores de células endoteliales convencionales. La identidad de las CEAT utilizadas en estos experimentos se confirmó mediante citometría de flujo (datos no mostrados) y RT-PCR utilizando CD31, VEGFR2, TIE2, VE-CADH, CK8 y E-CADH en las CEAT, células endoteliales de la piel (CEP), células epiteliales y fibroblastos. GAPDH se utilizó como un control interno. c. Las CEAT activan la señalización de MAPK en respuesta a la estimulación con Bv8. Las células se trataron con Bv8 (200 ng/ml), VEGF (control positivo; 40 ng/ml), medio completo (MC) o simulado (DSA al 0,5 %), durante 5, 10 y 20 minutos a 37 °C. Los análisis de transferencia de Western, descritos en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 1, detectaron MAPK fosforilada (P-MAPK) en las células tratadas con Bv8, mientras que el tratamiento simulado (PBS) no indujo la activación de P-MAPK. d. Bv8 no induce la proliferación de las células tumorales. Las células A673, Calu-6, HM7 y HPAC se trataron con distintas concentraciones de Bv8 recombinante y después se pulsaron con BrdU. La proliferación se cuantificó mediante la incorporación de BrdU.

55 **Figura complementaria 9. a.** Bv8 promueve la angiogénesis tumoral. Ratones que tenían tumor HM7 recibieron una única dosis intratumoral de Ad-LacZ, Av-Bv8 de bajo título, Av-Bv8 de alto título y Av-VEGF 5 días después del implante tumoral. Se midieron las áreas de superficie vascular 4 días después del suministro del adenovirus, utilizando la tinción MECA-32 de las secciones tumorales. b. El tratamiento anti Bv8 dio como resultado la inhibición de la angiogénesis tumoral. Se implantaron ratones desnudos beige con células Jurkat y se trataron con anticuerpos de control (paneles a-c), anti Bv8 (paneles d-f) y anti VEGF (paneles g-i). Se debe advertir la notable supresión de la angiogénesis tumoral mediante el tratamiento anti Bv8 o anti VEGF. Los paneles l, b, s, e, g, h y son tinción de H y E y los paneles c, f, t son tinciones de MECA-32 (las áreas tumorales se indican mediante asterisco).

65 **Figura complementaria 10. El papel de Bv8 en el crecimiento tumoral.** Las células tumorales y del estroma asociado al tumor señalizan la regulación positiva de Bv8 en la MO a través de la liberación de quimiocinas y de

citocinas tales como G-CSF, IL-6 y SDF-1. Bv8 puede amplificar la movilización de células mieloides causada por G-CSF mediante mecanismos autocrinos y paracrinos. Se sabe que la necrosis tumoral promueve la infiltración de células mieloides. Las células mieloides dirigidas al tumor mediante diversos mecanismos pueden producir de forma local Bv8, lo que a su vez estimula de forma directa la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis. Las citocinas, la hipoxia y la terapia anti VEGF también pueden dar como resultado el aumento de la expresión de Bv8 en las células mieloides dentro del microentorno tumoral. La Bv8 que producen las células mieloides infiltrantes de tumor también puede ser señal para la MO para promover adicionalmente movilización, migración transendotelial y el direccionamiento de células mieloides hacia el tumor.

10 **Tabla complementaria 1.** Los niveles de citocinas en medio condicionado de células tumorales de ser humano o de fibroblastos de ratón asociados a tumor aislados y cultivados de xenoinjertos.

15 **Tabla complementaria 2.** Diversas líneas celulares tratadas con G-CSF o GM-CSF a 10 ng/ml durante 4 horas. Posteriormente se extrajo el ARN y se sometió a análisis de Taqman utilizando RPL19 como el gen constitutivo para la normalización. Se muestra el cambio en veces con las no tratadas siendo 1. *** p<0,01 contra el control no tratado. Se realizaron tres estudios independientes.

Descripción detallada de la invención

20 Antes de describir la presente invención en detalle, debe comprenderse que la presente invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es para fines de la descripción de las realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante. Como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “ellos/ellas” incluyen referentes plurales a menos que el contenido claramente estipule lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una molécula” opcionalmente incluye una combinación de dos o más de tales moléculas, y similares.

A. Definiciones

30 Las expresiones “Bv8”, “homólogo de Bv8”, “procinética 2”, (también conocida como “PK2”, “KAL4”, y “MIT1”) también se utilizan en el presente documento indistintamente, y se refieren a una secuencia nativa, polipéptido Bv8, variantes de Bv8, y Bv8 quimérica, cada una de los cuales se define en el presente documento.

35 El ácido nucleico de Bv8 es ARN o ADN que codifica un polipéptido Bv8, como se define anteriormente, o el cual hibrida con tal ADN o ARN y permanece unido de forma estable a él en condiciones de hibridación rigurosas y es más grande de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. Las condiciones de rigurosidad son aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,15 M/citrato de sodio 0,015 M/NaDodSO₄ al 0,1 % a 50 °C, o (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (vol/vol) con seroalbúmina bovina al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C.

45 El ácido nucleico está unido operativamente cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. El ácido nucleico de Bv8 puede estar unido operativamente con otra secuencia de ácido nucleico en un vector de modo que se pueda expresar en un organismo hospedador particular. Esto puede hacerse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o un líder secretor que está unido operativamente al ADN para un polipéptido, si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionado de forma tal que facilita la traducción. En general, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se lleva a cabo mediante el ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, entonces se utilizan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

55 “Bv8 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que Bv8 obtenido de la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Por lo tanto, Bv8 de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de Bv8 de ser humano, Bv8 murina, o Bv8 de cualquier otra especie de mamífero, de origen natural. Por ejemplo una secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa de Bv8 de ser humano se muestra en la Figura 8 (SEQ ID NO: 2). En la Figura 10 se muestra una segunda secuencia nativa de longitud completa de Bv8 de ser humano (SEQ ID NO: 4). Estas dos secuencias son el resultado de el corte y empalme alternativo de un exón que codifica un dominio de unión a heparina canónico. Por lo tanto Bv8 de ser humano de secuencia nativa cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 8 (SEQ ID NO: 2) comprende un dominio de unión a heparina, aunque Bv8 de secuencia nativa representada en la Figura 10 (SEQ ID NO: 4) no. En la figura 12 se muestra una secuencia de aminoácidos de Bv8 de ratón de secuencia nativa (SEQ ID NO: 6). Las secuencias de Bv8 de ser humano y murina también se divulgan, por ejemplo, en Wechselberger *et al.* (FEBS Lett.

462: 177-181 (1999)) y Li *et al.* (Mol. Pharm. 59: 692-698 (2001)). Tal Bv8 de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "Bv8 de secuencia nativa" abarca de forma específica formas prepro, pro y maduras de origen natural y formas truncadas de Bv8, formas variantes de origen natural (por ejemplo formas cortadas y empalmadas de forma alternativa, tales como la mostrada en la Figura 10 (SEQ ID. NO: 4)), y variantes alélicas de origen natural. Una Bv8 de secuencia nativa preferente es una Bv8 de ser humano de secuencia nativa de longitud completa como se muestra en la Figura 8 (SEQ ID NO: 2).

Las "variantes de Bv8" son polipéptidos Bv8 biológicamente activos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de un polipéptido Bv8 de secuencia nativa, tal como los mostrados en las Figuras 8, 10 y 12 (SEQ ID NO: 2, 4 y 6) para Bv8 de ser humano y murina, en virtud de una inserción, delección, modificación y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia nativa. Las variantes de Bv8 en general tienen menos del 100 % de identidad de secuencia con una Bv8 de secuencia nativa, tal como la Bv8 de ser humano de la Figura 8 (SEQ ID NO: 2). Normalmente, sin embargo, una variante de Bv8 biológicamente activa tendrá una secuencia de aminoácidos con por lo menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una Bv8 de origen natural tal como la Bv8 de ser humano de la Figura 8 (SEQ ID NO: 2), preferentemente por lo menos aproximadamente el 75 %, más preferentemente por lo menos aproximadamente el 80 %, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente el 85 %, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente el 90 %, con preferencia creciente de por lo menos aproximadamente el 95 % hasta por lo menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, en aumentos del 1 %. Las variantes de Bv8 incluyen fragmentos peptídicos de por lo menos 5 aminoácidos que conservan una actividad biológica del correspondiente polipéptido Bv8 de secuencia nativa. Las variantes de Bv8 también incluyen polipéptidos Bv8 en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden al extremo N o C, o dentro, de una secuencia Bv8 nativa. Las variantes de Bv8 también incluyen polipéptidos Bv8 en donde varios restos de aminoácidos se delecionan o sustituyen de forma opcional por uno o más restos de aminoácidos. Las variantes de Bv8 también pueden estar modificadas de forma covalente, por ejemplo mediante la sustitución con un residuo que no sea un aminoácido de origen natural o modificando un resto de aminoácido para producir un aminoácido que no es de origen natural. Las variantes de Bv8 pueden comprender un dominio de unión a heparina.

En general, una "variante" de polipéptido (es decir una variante de cualquier polipéptido divulgado en el presente documento) significa un polipéptido biológicamente activo que tiene por lo menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el correspondiente polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden uno o más restos de aminoácidos (aminoácido de origen natural y/o un aminoácido que no es de origen natural) o se delecionan, en el extremo N y/o C del polipéptido. Normalmente, una variante tendrá por lo menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o por lo menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o por lo menos aproximadamente el 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Las variantes también incluyen fragmentos de polipéptido (por ejemplo, subsecuencias, truncamientos, etc.), normalmente biológicamente activos, de la secuencia nativa.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e de introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de la determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversos modos que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles de forma pública tales como los programas informáticos BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para el alineamiento de medición, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa a comparar. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación, utilizando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., ha sido presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D. C., 20559, en donde está registrado con el U.S. n.º de registro de derechos de autor de Estados Unidos TXU510087, y está disponible de forma pública a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, por ejemplo, UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 establece todos los parámetros de comparación de secuencias y no varían.

Para los fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una dada secuencia de aminoácidos A con respecto, con, o frente a una dada secuencia de aminoácidos B (que puede como alternativa expresarse como una dada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto, con, o frente a una dada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

en donde X es el número de restos de aminoácidos valorados como emparejamientos idénticos mediante el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y en donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

Una molécula "Bv8 quimérica" es un polipéptido que comprende a Bv8 de longitud completa o uno o más dominios de la misma fusionados o enlazados a un polipéptido heterólogo. La molécula de Bv8 quimérica en general compartirá por lo menos una propiedad biológica en común con Bv8 de origen natural. Un ejemplo de una molécula de Bv8 quimérica es una que está etiquetada con epítipo con fines de purificación. Otra molécula de Bv8 quimérica es una inmunoadhesina BV8.

La expresión "etiquetado con epítipo" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende Bv8 fusionada a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo frente al cual se puede preparar un anticuerpo, pero es suficientemente corto de forma que no interfiere con la actividad biológica de Bv8. Preferentemente, el polipéptido etiqueta es bastante exclusivo de forma tal que el anticuerpo frente a él esencialmente no reaccione de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados en general tienen por lo menos seis restos de aminoácido y normalmente entre aproximadamente 8-50 restos de aminoácido (preferentemente entre aproximadamente 9-30 restos). Son preferentes las polihistidinas (secuencias que se unen a níquel, permitiendo el aislamiento de la proteína etiquetada mediante cromatografía de Ni-NTA, como se describe (véase, por ejemplo, Lindsay *et al.* Neuron 17: 571-574 (1996)).

"Bv8 aislado" significa Bv8 que se ha purificado a partir de una fuente de Bv8 o se ha preparado mediante métodos recombinantes o sintéticos y purificado. Bv8 purificado está esencialmente libre de otros polipéptidos o péptidos. "Esencialmente libre" aquí significa menos de aproximadamente el 5 %, preferentemente menos de aproximadamente el 2 %, más preferentemente menos del aproximadamente 1 %, incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 0,5 %, muy preferentemente menos de aproximadamente el 0,1 % de contaminación con otras proteínas fuente.

Proteína "esencialmente pura" significa una composición que comprende por lo menos aproximadamente el 90 % en peso de la proteína, a base del peso total de la composición, preferentemente por lo menos aproximadamente el 95 % en peso, más preferentemente por lo menos aproximadamente el 90 % en peso, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente el 95 % en peso. Proteína "esencialmente homogénea" significa una composición que comprende por lo menos aproximadamente el 99 % en peso de la proteína, a base del peso total de la composición.

El término "antagonista", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir las actividades de una proteína de la invención incluyendo su unión a uno o más receptores en el caso de un ligando o la unión a uno o más ligandos en el caso de un receptor. Los antagonistas incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional y de la traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína de la invención, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen de forma específica a la proteína secuestrando de este modo su unión a su diana, variantes antagonistas de la proteína, moléculas antisentido dirigidas a una proteína de la invención, aptámeros de ARN, y ribozimas frente a una proteína de la invención.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Determinados anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben, esencial o completamente, la actividad biológica del antígeno.

La expresión "antagonista de Bv8", como se utiliza en el presente documento en el contexto de la invención, se refiere a anticuerpos anti Bv8 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que bloquean, inhiben o neutralizan parcial o completamente la capacidad de una Bv8 de secuencia nativa para modular la movilización mieloide y/o para promover la angiogénesis durante el desarrollo tumoral. En el presente documento también se describen otras moléculas antagonistas que incluyen proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional y de traducción, y similares. Los antagonistas descritos también incluyen inhibidores de Bv8 de molécula pequeña, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen de forma específica a Bv8 secuestrando de este modo su unión a su diana, variantes antagonistas de Bv8, moléculas antisentido dirigidas a Bv8, aptámeros de ARN, y ribozimas frente a Bv8.

Los métodos para identificar antagonistas de un polipéptido Bv8 pueden comprender poner en contacto un polipéptido Bv8 con una molécula antagonista candidata y medir un cambio detectable en la capacidad de Bv8 para modular la movilización de células mieloides y/o de promover la angiogénesis tumoral.

“Activo” o “actividad”, en relación con Bv8 o G-CSF, para los fines del presente documento se refiere a la(s) forma(s) de Bv8 o G-CSF que conservan una actividad biológica y/o inmunitaria de Bv8 o G-CSF nativa o de origen natural, en los que actividad “biológica” se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) que provoca una Bv8 o G-CSF nativa o de origen natural, distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico que posee una Bv8 o G-CSF nativa o de origen natural, y una actividad “inmunitaria” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico que posee una Bv8 o G-CSF nativa o de origen natural. Una actividad biológica de Bv8 preferente es la capacidad de modular la movilización de células mieloides y/o de promover la angiogénesis tumoral.

“Receptor de Bv8” es una molécula a la que se une Bv8 y que media las propiedades biológicas de Bv8. Por lo tanto, la expresión “receptor de Bv8” incluye dentro de su significado al receptor de PKR1/EG-VEGF 1 y al receptor de PKR2/EG-VEGF 2 (Le-Couter *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 2685-2690; Lin *et al.*, 2002, J Biol. Chem., 277: 19276-19280; Masuda *et al.*, 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 293: 396-402).

El término “VEGF” como se utiliza en el presente documento se refiere a un factor de crecimiento endotelial vascular de secuencia nativa y las variantes del mismo.

Los términos “VEGF” y “VEGF-A” se utilizan indistintamente para referirse al factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos de secuencia nativa y a los factores de crecimiento celular endotelial vascular de 121, 145, 183, 189, 206 aminoácidos relacionados, como describe Leung *et al.* Science, 246: 1306 (1989), Houck *et al.* Mol. Endocrin., 5: 1806 (1991), y, Robinson y Stringer, Journal of Cell Science, 144(5): 853-865 (2001), junto con las formas alélicas de origen natural y las procesadas de los mismos, así como las variantes de los mismos. VEGF-A es parte de una familia génica que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, y PlGF. VEGF-A se une principalmente a dos receptores tirosina cinasas de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo el último el principal transmisor de las señales mitogénicas de VEGF-A de células endoteliales vasculares. El término “VEGF” o “VEGF-A” también se refiere a las VEGF de especies que no son humanas tales como ratón, rata, o primate. En ocasiones VEGF de una especie específica se indica mediante términos tales como VEGFh para VEGF de ser humano o VEGFm para VEGF murina. El término “VEGF” también se utiliza para hacer referencia a las formas truncadas o fragmentos del polipéptido que comprenden a los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular de ser humano de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF se puede identificar en la presente solicitud, por ejemplo, mediante “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)” o “VEGF₁₆₅”. Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativa “truncada” se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición 17 de aminoácido (metionina) en VEGF nativa truncada es también la posición 17 (metionina) en VEGF nativa. VEGF nativa truncada tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable con VEGF de secuencia nativa.

Un “antagonista de VEGF” se refiere a una molécula (peptidilo o no peptidilo) capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con actividades de una VEGF de secuencia nativa que incluye su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen de forma específica a VEGF secuestrando de este modo su unión a uno o más receptores (por ejemplo, proteínas receptoras de VEGF solubles, o fragmentos de unión a VEGF de las mismas, o proteínas receptoras de VEGF quiméricas), anticuerpos anti receptor de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF, tales como inhibidores de molécula pequeña de las VEGFR tirosina cinasas, y proteínas de fusión, por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF₁₂₁-gelonina (Peregine). Los antagonistas de VEGF también incluyen variantes de antagonistas de VEGF, moléculas antisentido dirigidas a VEGF, aptámeros de ARN, y ribozimas frente a VEGF o receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen adicionalmente compuestos peptidilo o no peptidilo que se unen de forma específica a VEGF, tales como anticuerpos anti VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, polipéptidos, o fragmentos de los mismos que se unen de forma específica a VEGF; oligómeros de nucleobases antisentido complementarios a por lo menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de VEGF; ARN pequeños complementarios a por lo menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de VEGF; ribozimas que tienen como diana a VEGF; peptidocuerpos para VEGF; y aptámeros de VEGF. En una realización, el antagonista de VEGF reduce o inhibe, por lo menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, el nivel de expresión o la actividad biológica de VEGF. En otra realización, el VEGF que inhibe el antagonista de VEGF es VEGF (8-109), VEGF (1-109) o VEGF₁₆₅.

La expresión “anticuerpo anti VEGF” o “un anticuerpo que se une a VEGF” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a VEGF con afinidad y especificidad suficientes para que el anticuerpo sea útil como un agente diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento hacia VEGF. Por ejemplo, el anticuerpo anti VEGF de la invención se puede utilizar como un agente terapéutico en el direccionamiento hacia, e interferencia con, enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de VEGF. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.703.020; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202, el documento WO2005/044853; el documento EP 0666868B1; las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208, y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y el documento WO2005012359. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte por VEGF, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a VEGFh con un valor

de K_d de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades del anticuerpos se pueden determinar mediante ensayos basados en resonancia de plasmón superficial (tales como el ensayo BIAcore™ como se describe en la Solicitud PCT Publicación n.º WO2005/012359); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo RIA), por ejemplo. Puede someterse al anticuerpo a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como un producto terapéutico. Tales ensayos son conocidos en la técnica y dependen de los antígenos diana y del uso pretendido para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición HUVEC; ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) (Patente de Estados Unidos 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o de hematopoyesis (véase el documento WO 95/27062). Normalmente, un anticuerpo anti VEGF no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o VEGF-E; ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. En una realización, los anticuerpos anti VEGF incluyen un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti VEGF A4.6.1 que produce el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599, que incluye pero sin limitación al anticuerpo conocido como "bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMab VEGF" o "AVASTIN®". Bevacizumab comprende regiones marco conservadas de IgG1 de ser humano mutada y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti VEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión de VEGF de ser humano a sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, que incluye la mayoría de las regiones marco conservadas, se obtiene de IgG1 de ser humano, y aproximadamente 7 % de la secuencia se obtiene del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glucosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos anti VEGF humanizados se describen adicionalmente en la Patente de Estados Unidos n.º 6.884.879 expedida el 26 de febrero de 2005. Los anticuerpos preferentes adicionales incluyen los anticuerpos de las series G6 o B20 (por ejemplo, G6-23, G6-31, B20-4.1), como describe la Publicación de Solicitud de entrada n.º WO2005/012359. Para anticuerpos preferentes adicionales véanse las Patente de Estados Unidos n.º 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202; el documento EP 0666868B1; las Solicitudes de Patente de Estados Unidos n.º de Publicación 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; y Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004).

Un "anticuerpo de la serie G6" de acuerdo con la presente invención, es un anticuerpo anti VEGF que se obtiene de una secuencia de un anticuerpo de G6 o un anticuerpo obtenido de G6 de acuerdo con una cualquiera de las Figuras 7, 24-26, y 34-35 de la Solicitud PCT de n.º de Publicación No. WO2005/012359.

Una "célula progenitora/madre hematopoyética" o "célula hematopoyética primitiva" es una que es capaz de diferenciarse para constituir un tipo celular sanguíneo más comprometido o maduro. Los "linajes de células sanguíneas linfoides" son aquellas células precursoras hematopoyéticas que son capaces de diferenciarse para formar linfocitos (linfocitos B o linfocitos T). Así mismo, "linfopoyesis" es la formación de linfocitos. Los "linajes de células sanguíneas eritroides" son aquellas células precursoras hematopoyéticas que son capaces de diferenciarse para formar eritrocitos (glóbulos rojos) y "eritropoyesis" es la formación de eritrocitos.

La expresión "linajes de células sanguíneas mieloides", para los fines de la presente invención, abarca todas las células progenitoras hematopoyéticas, que no sean linajes de células sanguíneas linfoides y eritroides como se define anteriormente, y "mielopoyesis" implica la formación de células sanguíneas (que no sean linfocitos y eritrocitos).

Una población de células mieloides se puede enriquecer en células inmunitarias mieloides que sean Gr1+/CD11b+ (o CD11b+Gr1+) o Gr1+/Mac-1+. Estas células expresan un marcador para células mieloides del linaje de macrófagos, CD11b, y un marcador para granulocitos, Gr1. Una Gr1+/CD11b+ se puede seleccionar mediante selección inmunoadherente, por ejemplo, con un anticuerpo para Gr1+.

Un "agente de reducción de células mieloides" o "agente reductor de células mieloides" se refiere a un agente que reduce o elimina una población celular mieloides. Normalmente, el agente reductor de células mieloides reducirá o eliminará células mieloides, CD11b+Gr1+, monocitos, macrófagos, etc. Los ejemplos de agentes reductores de células mieloides incluyen, pero sin limitación, antagonista de Gr1+, antagonista de CD11b, antagonista de CD18, inhibidor de la elastasa, antagonista de MCP-1, antagonista de M1P-1 alfa, etc.

La expresión "antagonista de Gr1" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula que se une a Gr1 e inhibe o esencialmente reduce una actividad biológica de Gr1. Los ejemplos no limitantes de antagonistas de Gr1 incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional o de la traducción, y similares. En una realización descrita en el presente documento, el antagonista de Gr1 es un anticuerpo, en especial un anticuerpo anti Gr1 que se une Gr1 de ser humano.

La expresión “antagonista de CD11b” cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que se une a CD11b e inhibe o esencialmente reduce una actividad biológica de CD11b. Normalmente, el antagonista bloqueará (de forma parcial o completa) la capacidad de una célula (por ejemplo célula mieloide inmadura) que expresa la subunidad CD11b en su superficie celular para unirse al endotelio. Los ejemplos no limitantes de los antagonistas de CD11b incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional o de la traducción, y similares. En una realización descrita en el presente documento, el antagonista de CD11b es un anticuerpo, en especial un anticuerpo anti CD11b que se une a CD11b de ser humano. Los anticuerpos de CD11b ejemplares incluyen MY904 (Patente de Estados Unidos n.º 4.840.793); 1B6c (véase Zhang *et al.*, Brain Research 698: 79-85 (1995)); CBRN1/5 y CBRM1/19 (documento WO94/08620).

La expresión “antagonista de CD18” cuando se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula que se une a CD18 (preferentemente CD18 de ser humano) e inhibe o esencialmente reduce una actividad biológica de CD18. Normalmente, el antagonista bloqueará (de forma parcial o completa) la capacidad de una célula (por ejemplo un neutrófilo) que expresa la subunidad CD18 en su superficie celular para unirse al endotelio. Los ejemplos no limitantes de antagonistas del CD18 incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional o de la traducción, y similares. En una realización descrita en el presente documento, el antagonista de CD18 es un anticuerpo.

Los ejemplos de anticuerpos anti CD18 incluyen MHM23 (Hildreth *et al.*, Eur. J. Immunol. 13: 202-208 (1983)); M18/2 (IgG_{2a}; Sanches-Madrid *et al.*, J. Exp. Med. 158: 586-602 (1983)); H52 (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) depósito HB 10160); Mas191c y 1OT18 (Vermot Desroches *et al.*, Scand. J. Immunol. 33: 277-286 (1991)); y NA-8 (documento WO 94/12214). En una realización, el anticuerpo es uno que se une al epítipo de CD18 al que se unen MHM23 o H52. En una realización descrita en el presente documento, el anticuerpo tiene una alta afinidad por el polipéptido CD18. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se puede unir a una región en el dominio extracelular de CD18 que se asocia con CD11b y el anticuerpo también puede disociar las cadenas a y P (por ejemplo el anticuerpo puede disociar el complejo CD11b y CD18 como es el caso del anticuerpo MHM23).

La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) es una quimiocina implicada en la inmunidad innata y la respuesta efectora Th2, y la diferenciación de linfocitos T CD4+. Véase, por ejemplo, Paul, W. E., Fundamental Immunology, 51ª Edición, Lippincott Williams & Wilkins, (Filadelfia, 2003) en las páginas 801-840.

La expresión “antagonista de MCP-1” cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que se une a MCP-1 e inhibe o esencialmente reduce una actividad biológica de MCP-1. Los ejemplos no limitantes de los antagonistas de MCP-1 incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional y de la traducción, y similares. En una realización descrita en el presente documento, el antagonista de MCP-1 es un anticuerpo, en especial un anticuerpo anti MCP-1 que se une a MCP-1 de ser humano.

Las proteínas inflamatorias de macrófago alfa y beta (MIP-1 alfa y beta) son quimiocinas conocidas. MIP-1 alfa está implicada en la inmunidad innata y la respuesta efectora Th1, y la diferenciación de linfocitos T CD4+. Véase, por ejemplo, Paul, W. E., Fundamental Immunology, 5ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, (Filadelfia, 2003) en las páginas 801-840.

La expresión “antagonista de MIP-1 alfa” cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que se une a MIP-1 alfa e inhibe o esencialmente reduce una actividad biológica de MIP-1 alfa. Los ejemplos no limitantes de antagonistas de MIP-1 alfa incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional y de la traducción, y similares. En una realización descrita en el presente documento, el antagonista de MIP-1 alfa es un anticuerpo, en especial un anticuerpo anti MIP-1 alfa que se une a MIP-1 alfa de ser humano.

Una “URCGP” se refiere a una proteína que está regulada de forma positiva en las células CD11b+Gr1+ de tumores resistentes a anti VEGF. Las URCGP incluyen, pero sin limitación, la elastasa de neutrófilos, CD14, expi, IL-13R, LDLR, TLR-1, RLF, Endo-Lip, SOCS13, FGF13, IL-4R, IL-11R, IL-1RII, IFN TM1, TNFRSF18, WNT5A, Membrana transportadora secretora 1, HSP86, EGFR, EphRB2, GPCR25, HGF, similar a angiopoyetina 6, Eph-RA7, semaforina VIb, neurotrofina 5, Claudina-18, MDC15, ECM y ADAMTS7B. En determinada realización las URCGP se refieren a IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13 y/o IL-4R.

Una “DRCGP” se refiere a una proteína que está regulada de forma negativa en células CD11b+Gr1+ de tumores resistentes a anti VEGF. Las DRCGP incluyen, pero sin limitación, THBS1, Crea7, Aquaporina-1, proteína de la familia de transportadores de solutos (SCF38), apolipoproteína E (APOE), proteína de unión de ácidos grasos (FABP), NCAM-140, Fibronectina tipo III, WIP, CD74, ICAM-2, Jagged 1, Itga4, ITGB7, TGF-BII-R, TGFb IEP,

Smad4, BMPR1A, CD83, Dectina-1, CD48, E-selectina, IL-15, Supresor de la señalización de citocinas 4, Cyt4 y CX3CR1. En determinada realización, las DRCGP se refieren a ThBS1 y/o a Crea7.

5 Una "URRTP" se refiere a una proteína que está regulada de forma positiva en tumores resistentes a anti VEGF. Las URRTP incluyen, pero sin limitación, Notch2, DMD8, MCP-1, ITGB7, G-CSF, IL-8R, MIP2, MSCA, GM-CSF, IL-1R, Meg-SF, HSP1A, IL-1R, G-CSFR, IGF2, HSP9A, FGF18, ELM 1, Ldgfa, receptor eliminador tipo A, lectina tipo C de macrófago, Pigr3, SRT-1 de Macrófago, receptor acoplado a proteína G, ScyA7, IL-1R2, proteína inducible por IL-1, IL-1 beta y Precursor ILIX. En determinada realización, las URRTP se refieren a MSCA, MIP2, IL-8R y/o G-CSF.

10 Una "DRRTP" se refiere a una proteína que está regulada de forma negativa en tumores resistentes a anti VEGF. Las URRTP incluyen, pero sin limitación, IL10-R2, Verb-2.1, Caveolina3, Semcap3, INTG4, THBSP-4, Ebb3, JAM, Eng, JAM, Eng, JAM-2, Pecam1, Tlr3, TGF-B, FIZZ1, Wfs1, TP 14A, EMAP, SULF-2, Matriz extracelular 2, CTFG, TFPI, XCP2, Ramp2, ROR-alfa, Efrina B1, similar a SPARC 1, y Semaforina A. En determinadas realizaciones, la DRRTP se refiere a IL10-R2, THBSP-4, y/o JAM-2.

15 El término "detección" se utiliza en el amplio sentido para incluir las mediciones cualitativas y cuantitativas de una molécula diana.

20 La expresión "muestra biológica" se refiere a una muestra corporal de cualquier animal, pero preferentemente es de un mamífero, más preferentemente de un ser humano. Tales muestras incluyen líquidos biológicos tales como sangre, suero, plasma, médula ósea, humor vítreo, líquido linfático, líquido sinovial, líquido folicular, semen, líquido amniótico, leche, sangre entera, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, lágrimas, sudor, moco, y medio de cultivo de tejidos, así como extractos tisulares tales como tejido homogeneizado, y extractos celulares. La muestra biológica preferente en el presente documento es una muestra de suero, plasma, orina o médula ósea

25 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre de forma específica anticuerpos monoclonales (que incluye anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo (véase a continuación) en tanto muestren la actividad biológica deseada.

30 A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo multivalente" se utiliza en toda la presente especificación para indicar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente normalmente se modifica por ingeniería genética para tener los tres o más sitios de unión a antígeno y en general no es un anticuerpo IgM o IgA de secuencia nativa.

35 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, que en general incluyen un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y así conservan la capacidad de unirse a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo abarcados en la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más restos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CH1 y uno o más restos cisteína en el extremo del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocatenarios (por ejemplo Fv monocatenario; scFv) (Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988); y Huston *et al.*, PNAS (USA) 85: 5879-5883 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10): 1057 1062 (1995); y Patente de Estados Unidos n.º 5.641.870).

55 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto en posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el "monoclonal" modificador indica el carácter del anticuerpo como no siendo una mezcla de anticuerpos discretos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único antígeno. En determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en el que la secuencia de polipéptido de unión a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una secuencia de polipéptido de unión a la diana única a partir de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon exclusivo a partir de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones hibridoma, clones de fagos, o clones de ADN recombinante. Debería comprenderse que una secuencia seleccionada de unión a la diana puede alterarse adicionalmente, por ejemplo,

para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia alterada de unión a la diana también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen anticuerpos distintos dirigidos frente a determinantes distintos (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

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

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen de forma específica anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, aunque el resto de la(s) cadena(s) sean idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, en tanto muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos que no son de ser humano (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen un mínimo de secuencia obtenida de inmunoglobulina que no es de ser humano. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas de ser humano (anticuerpo destinatario) en las que los restos de una región hipervariable del destinatario se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie que no es de ser humano (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate que no es ser humano que tenga la actividad, afinidad y capacidad deseada. En algunos ejemplos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina de ser humano se reemplazan por los restos que no son de ser humano correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo destinatario o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente todos o por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o esencialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina que no es de ser humano y todas o esencialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina de ser humano. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina de ser humano. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994); y las Patentes de Estados Unidos n.º 6.982.321 y 7.087.409. Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenoratos inmunizados (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos de ser humano generados a través de una tecnología del hibridoma de linfocitos B de ser humano.

Un “anticuerpo de ser humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo que produce un ser humano y/o se ha preparado utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos de ser humano como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo de ser

humano excluye de forma específica un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno que no son de ser humano. Los anticuerpos de ser humano se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo de ser humano se selecciona de una fagoteca, en donde la fagoteca expresa anticuerpos de ser humano (Vaughan *et al.* Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996); Sheets *et al.* PNAS (USA) 95: 6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los anticuerpos de ser humano también se pueden preparar introduciendo locus de inmunoglobulina de ser humano en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado de forma parcial o completa. Después de la exposición se observa la producción de anticuerpos de ser humano, que se asemeja estrechamente en todos los aspectos a la vista en seres humanos, incluyendo reordenamiento génico, ensamblaje, y repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Como alternativa, el anticuerpo de ser humano se puede preparar a través de la inmortalización de linfocitos B de ser humano que producen un anticuerpo dirigido frente a un antígeno diana (tales linfocitos B se pueden recuperar a partir de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991); y la Patente de Estados Unidos n.º 5.750.373.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de captura del anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de forma uniforme en todos los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones hipervariables en los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectados mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se sujetan juntas en proximidad estrecha mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados de forma directa en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos

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

Varios de los delineamientos de HVR se utilizan y están abarcados en el presente documento. Las Regiones Determinantes de Complementariedad de Kabat (CDR) son a base de la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio al emplazamiento de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol Biol 196: 901-917 (1987)). Los HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y los utiliza el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular's. Los HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas del complejo disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

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

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

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

5 Los restos de "región marco conservada" o "FR" son aquellos restos del dominio variable que no son los restos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

10 La expresión "numeración de restos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera del compendio de anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener algunos, o adicionales, aminoácidos que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de restos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante la alineación de las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

20 A lo largo de toda la presente especificación y las reivindicaciones, el sistema de numeración de Kabat se utiliza en general cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente, restos 1-107 de la cadena ligera y restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración de EU" o "índice de EU" en general se utiliza cuando se hace referencia a un resto en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU descrito en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). A menos que en el presente documento se establezca lo contrario, las referencias a los números de restos en el dominio variable de anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se establezca lo contrario en el presente documento las referencias a números de restos en el dominio variable de anticuerpos se refiere a la numeración de restos por el sistema de numeración de EU (por ejemplo, véase la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/640.323, Figuras para la numeración de EU).

35 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden adicionalmente dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁ (que incluye los alotipos no A y A), IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden con las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y están descritas en general en, por ejemplo, Abbas *et al.* Cellular and Mol. Immunology, 4ª ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

45 Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno o más tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), a base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

50 La expresión "región Fc" se utiliza para definir la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede generarse mediante digestión de un anticuerpo intacto con papaína. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG de ser humano se define normalmente para extenderse desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el extremo carboxilo de la región Fc. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante la modificación por ingeniería genética de forma recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpo que tengan una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447. La región Fc de una inmunoglobulina en general comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y de forma opcional comprende un dominio CH4.

A menos que se indique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice de EU como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de IgG1 de ser humano.

65

Por "cadena de la región Fc" en el presente documento se entiende una o las dos cadenas de polipéptido de una región Fc.

5 El "dominio CH2" de una región Fc de IgG de ser humano (que también recibe el nombre de dominio "Cg2") se extiende normalmente desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 231 hasta un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 340. El dominio CH2 es exclusivo en que no está estrechamente emparejado con otro dominio. En su lugar, entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificados N-ligados. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton,
10 Molec. Immunol.22: 161-206 (1985). El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o dominio CH2 variante.

15 El "dominio CH3" comprende la extensión de restos C terminales con respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 341 hasta un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida en una cadena del mismo y una correspondiente "cavidad" introducida en la otra cadena del mismo; véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.821.333).

20 Tales dominios CH3 variantes se pueden utilizar para preparar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos) como se describe en el presente documento.

25 La "región bisagra" se define en general como que se extiende desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de IgG1 de ser humano (Burton, Molec Immunol.22: 161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último restos cisteína formando enlaces S-S inter cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra en el presente documento puede ser una región bisagra de secuencia nativa o una región bisagra variante. Las dos cadenas de polipéptido de una región bisagra variante en general conservan por lo menos un resto cisteína por cadena de polipéptido, de manera que las dos cadenas de polipéptido de la región bisagra variante
30 pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferente en el presente documento es una región bisagra de ser humano de secuencia nativa, por ejemplo una región bisagra de IgG1 de ser humano de secuencia nativa.

35 Una "región Fc funcional" posee por lo menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo receptores de linfocitos B; RLB), etc. Tales funciones efectoras en general necesitan que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar utilizando diversos ensayos conocidos en la técnica para la evaluación
40 de tales funciones efectoras de anticuerpos.

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

50 Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa de ser humano) o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

55 Un "anticuerpo parental" o anticuerpo "de tipo silvestre" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que carece de una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con una variante de anticuerpo como se divulga en el presente documento. Por lo tanto, en general el anticuerpo parental tiene por lo menos una región hipervariable que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región hipervariable correspondiente de una variante de anticuerpo como se divulga en el presente documento. El polipéptido parental puede comprender un anticuerpo de secuencia nativa (es decir, una de origen nativa) (que incluye una variante alélica de origen natural), o un anticuerpo con modificaciones de la
60 secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como inserciones, deleciones y/u otras alteraciones) de una secuencia de origen natural. A lo largo de toda la divulgación, anticuerpo "de tipo salvaje", "TS", "ts", y "parental" o "padre" se utilizan indistintamente.

65 Como se usa en el presente documento, "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo parental.

Preferentemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera que tenga una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. Tales variantes de forma necesaria tienen menos del 100 % de identidad de secuencia o de similitud con el anticuerpo parental. En una realización preferente, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el 75 % hasta menos del 100 % de identidad de secuencia o de similitud de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente desde aproximadamente el 80 % a menos del 100 %, más preferentemente desde aproximadamente el 85 % a menos del 100 %, más preferentemente desde aproximadamente el 90 % a menos del 100 %, y muy preferentemente desde aproximadamente el 95 % a menos del 100 %. La variante de anticuerpo es en general una que comprenda una o más alteraciones de aminoácidos en, o adyacentes a, una o más regiones hipervariables del mismo.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido. En determinadas realizaciones, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo desde aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente desde aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental, por ejemplo desde aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferentemente desde aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento normalmente poseerá, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o por lo menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con ella, o por lo menos aproximadamente el 95 % o más de identidad de secuencia con ella.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos incluyen: unión a C1_q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite a estas células efectoras citotóxicas unirse de forma específica a una célula diana que porta al antígeno y posteriormente destruir la célula diana con citotoxinas. Las células principales para la mediación de ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o de forma adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

Las "células efectoras de ser humano" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinadas realizaciones, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan función/funciones efectora/efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos de ser humano que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo en general preferentes las células CMSP y las NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una fuente natural de las mismas, por ejemplo a partir de sangre o de CMSP, como se describe en el presente documento.

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

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

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

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

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

Un “conector flexible” en el presente documento se refiere a un péptido que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos por enlace/enlaces peptídicos, y proporciona más libertad rotacional para dos polipéptidos (tal como dos regiones Fd) unidos de este modo. Tal libertad rotacional permite que dos o más sitios de unión a antígeno unidos por el conector flexible accedan cada uno al antígeno(s) diana de forma más eficaz. Los ejemplos de secuencias de péptido de conector flexible adecuadas incluyen gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO: 34), ala-ser, y gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 35).

Un “dominio de dimerización” está formado por la asociación de por lo menos dos restos de aminoácidos (en general restos de cisteínas) o de por lo menos dos péptidos o polipéptidos (los que pueden tener las mismas, o distintas, secuencias de aminoácidos). Los péptidos o polipéptidos pueden interactuar entre sí a través de asociación/asociaciones covalentes y/o no covalentes. Los ejemplos de dominios de dimerización en el presente documento incluyen una región Fc; una región bisagra; un dominio CH3; un dominio CH4; una pareja CH1-CL; una “interfaz” con una “prominencia” y/o “protuberancia” modificada por ingeniería genética como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.821.333; una cremallera de leucina (por ejemplo, una cremallera de leucina jun/fos, véase Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992); o una cremallera de leucina GCN4 de levadura); una cremallera de isoleucina; una pareja dímero-receptor (por ejemplo, receptor de interleucina 8 (IL-8R); y heterodímeros de integrinas tales como LFA-1 y GPIIb/IIIa), o la región/regiones de dimerización de los mismos; polipéptidos ligando diméricos (por ejemplo factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), VEGF-C, VEGF-D, miembros PDGF, y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), véase Arakawa *et al.* J. Biol. Chem. 269(45): 27833-27839 (1994) y Radziejewski *et al.* Biochem. 32(48): 1350 (1993)), o la/las región/regiones de dimerización de los mismos; una pareja de restos cisteína capaces de formar un enlace disulfuro; una pareja de péptidos o polipéptidos, comprendiendo cada uno por lo menos un resto cisteína (por ejemplo desde aproximadamente uno, dos o tres a aproximadamente diez restos cisteína) de modo que se puedan formar enlaces disulfuro entre los péptidos o polipéptidos (en lo sucesivo en el presente documento “una bisagra sintética”); y dominios variables de anticuerpo. El dominio de dimerización más preferente en el presente documento es una región Fc o una región bisagra.

Un “sitio de unión a antígeno funcional” de un anticuerpo es uno que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de unión al antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como la del anticuerpo parental a partir del cual se obtuvo el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unión al antígeno debe ser medible utilizando uno cualquiera de diversos métodos conocidos para la evaluación de la unión del anticuerpo a un antígeno. Además, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente en el presente documento no necesita ser cuantitativamente la misma. Para los anticuerpos multiméricos en el presente documento, el número de sitios de unión a antígeno funcionales se puede evaluar

utilizando análisis de ultracentrifugación. De acuerdo con este método de análisis, se combinan distintas proporciones de antígeno diana con respecto al anticuerpo multimérico, y el peso molecular promedio de los complejos se calcula asumiendo números que difieren de sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos para evaluar el número de sitios de unión funcionales.

5 Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos en que se unen al mismo antígeno.

10 Para explorar los anticuerpos que se unen a un epítipo o un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

15 El término “epítipo” se utiliza para referirse a los sitios de unión para anticuerpos (monoclonales o policlonales) en antígenos de proteínas.

Por “anticuerpo antagonista de Bv8” se entiende un anticuerpo que es un antagonista de Bv8, como se define anteriormente en el presente documento, y así bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o completamente la capacidad de Bv8 para modular la movilización mieloide y/o para promover la angiogénesis durante el desarrollo tumoral.

20 La expresión “inmuno adhesina Bv8” se utiliza indistintamente con la expresión “quimera Bv8-inmunoglobulina”, y se refiere a una molécula quimérica que combina por lo menos una porción de una molécula Bv8 (nativa o variante) con una secuencia de inmunoglobulina. La secuencia de inmunoglobulina preferentemente, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina. Las inmuno adhesinas pueden poseer muchas de las propiedades químicas y biológicas valiosas de los anticuerpos de ser humano. Debido a que las inmuno adhesinas se pueden construir a partir de una secuencia de proteína de ser humano con una especificidad deseada, unida a una secuencia de bisagra y de dominio constante (Fc) de inmunoglobulina de ser humano apropiadas, la especificidad de unión de interés puede conseguirse utilizando componentes íntegramente de ser humano. Tales inmuno adhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente, y son seguras para el uso crónico o repetido.

30 Los ejemplos de inmuno adhesinas homomultiméricas que se han descrito para el uso terapéutico incluyen la inmuno adhesina CD4-IgG para el bloqueo de la unión de VIH a CD4 de la superficie celular. Los datos obtenidos de ensayos clínicos de Fase 1, en los que se administró CD4-IgG a mujeres embarazadas justo antes del parto, sugieren que esta inmuno adhesina puede ser útil en la prevención de la transferencia materno-fetal del VIH (Ashkenazi *et al.*, *Intern. Rev. Immunol.* 10: 219-227 (1993)). También se ha desarrollado una inmuno adhesina que une el factor de necrosis tumoral (TNF). TNF es una citoquina proinflamatoria que ha demostrado ser un mediador principal del choque septicémico. En base a un modelo de ratón de choque septicémico, una inmuno adhesina receptora de TNF ha mostrado ser promisorio como candidata para el uso clínico en el tratamiento de choque septicémico (Ashkenazi, A. *et al.* (1991) *PNAS USA* 88: 10535-10539). La U.S. Food and Drug Administration (FDA) aprobó el 2 de noviembre de 1998 ENBREL® (etanercept), una inmuno adhesina que comprende una secuencia del receptor de TNF fusionada con una región Fc de IgG, para el tratamiento de la artritis reumatoide. El nuevo uso expandido de ENBREL® en el tratamiento de la artritis reumatoide se aprobó por la FDA el 6 de junio del 2000. Para información reciente sobre los bloqueantes de TNF, que incluyen ENBREL®, véase Lovell *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 342: 763-169 (2000), y la editorial adjunta en las pág. 810-811; y Weinblatt *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 340: 253-259 (1999); revisado en Maini y Taylor, *Annu. Rev. Med.* 51: 207-229 (2000).

50 Si los dos brazos de la estructura de la inmuno adhesina tienen distintas especificidades, la inmuno adhesina se denomina una “inmuno adhesina biespecífica” por analogía con los anticuerpos biespecíficos. Dietsch *et al.*, *J. Immunol. Methods* 162: 123 (1993) describe tal inmuno adhesina biespecífica que combina los dominios extracelulares de las moléculas de adhesión E-selectina y P-selectina, cada una de las cuales se expresa en un tipo celular distinto en la naturaleza. Los estudios de unión indicaron que la proteína de fusión de inmunoglobulina biespecífica formada de tal modo tenía una capacidad potenciada para unirse a una línea celular mieloide, en comparación con las inmuno adhesinas mono específicas de las cuales se obtuvo.

55 El término “hetero adhesina” se utiliza indistintamente con la expresión “adhesina heteromultímero quimérica” y se refiere a un complejo de moléculas quiméricas (secuencias de aminoácidos) en el que cada molécula quimérica combina una porción biológicamente activa, tal como el dominio extracelular de cada uno de los monómeros receptores heteromultiméricos, con un dominio de multimerización. El “dominio de multimerización” promueve la interacción estable de las moléculas quiméricas dentro del complejo heteromultimérico. Los dominios de multimerización pueden interactuar a través de una secuencia de inmunoglobulina, cremallera de leucina, una región hidrófoba, una región hidrófila, o un tiol libre que forma un enlace disulfuro intermolecular entre las moléculas quiméricas del heteromultímero quimérico. El dominio de multimerización puede comprender una región constante de inmunoglobulina. Además, una región de multimerización puede modificarse por ingeniería genética de forma que las interacciones estéricas no sólo promuevan la interacción estable, sino que promueven adicionalmente la formación de heterodímeros por encima de los homodímeros de una mezcla de monómeros. Las “protuberancias” se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido con

5 cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Las “cavidades” compensatorias de tamaño igual o similar que las protuberancias, se crean de forma opcional en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). La secuencia de inmunoglobulina preferente, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina. El residuo de

10 Como se utiliza en el presente documento, “tratamiento” es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de los síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, patología estabilizada (es decir no empeoramiento), retraso o desaceleración de la evolución de la enfermedad, mejora o paliación de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sean detectables o no detectables. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. “Tratamiento” es una intervención llevada a cabo con la intención de prevenir el desarrollo o de modificar la patología de un

15 trastorno. Por consiguiente, “tratamiento” se refiere al tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan el tratamiento incluyen a los que ya tienen el trastorno así como a los que debe prevenirse el trastorno. Concretamente, el tratamiento puede de forma directa prevenir, frenar o por lo demás disminuir la patología de la degeneración o daño celular, tal como la patología de una enfermedad o afección asociada con la movilización de células mieloides y/o con la angiogénesis tumoral.

20 La expresión “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, enlentecer hasta cierto punto y normalmente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, enlentecer hasta cierto punto y normalmente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; permitir el tratamiento del tumor resistente, y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Hasta el punto que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo para la evolución de la enfermedad (TEE), las velocidades de respuesta (VR), la duración de la respuesta, y/o la calidad de vida.

30 Administración “crónica” se refiere a la administración del agente(s) de un modo continuo en oposición a uno de modo agudo, de modo que se mantiene el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un período prolongado de tiempo. Administración “intermitente” es el tratamiento que no se hace de forma consecutiva sin interrupción, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

35 “Mamífero” para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye seres humanos, que no sean primates superiores, roedores, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, deportes o de compañía, tales como ratones, ratas, perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

“Tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, ya sean malignos o benignos, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

45 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el estado fisiológico en los mamíferos que se caracteriza normalmente por el crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de riñón o renal, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, tumores estromales gastrointestinales (TEGI), cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecomas, arrenoblastoma, hepatoma, malignidades hematológicas que

50 incluyen linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple y malignidades hematológicas agudas, carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de la glándula salival, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de la piel, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, así como linfomas de linfocitos B (que incluyen linfoma no Hodgkin (LNH) de bajo grado/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de alto grado; LNH de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA);

65 leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores

cerebrales), y síndrome de Meigs. "Tumor" como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, ya sea malignos o benignos, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

5 La expresión "tumor resistente" se refiere a cáncer, células cancerosas, o un tumor que no responde completamente, o pierde o muestra una respuesta reducida durante el curso de la terapia del cáncer, a una terapia del cáncer que comprende por lo menos un antagonista de VEGF. Un tumor resistente también se refiere a un tumor diagnosticado como resistente en el presente documento (que también recibe el nombre en el presente documento de "tumor resistente anti VEGF"). En determinadas realizaciones, hay un aumento de células CD11b+Gr1+ en un tumor resistente en comparación con un tumor que es sensible a la terapia que incluye por lo menos un antagonista de VEGF.

15 La expresión "composición antineoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende por lo menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, un "agente antineoplásico". Los ejemplos de agentes terapéuticos (agentes antineoplásicos) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en la terapia de radiación, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina, toxinas, y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti VEGF, antagonista de VEGF, anti HER-2, anti CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de la tirosina cinasa), inhibidor HER1/EGFR, erlotinib, un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de ErbB2, ErbB3, ErbB4, o receptor/receptores de VEGF, inhibidores para los receptores tirosina cinasas para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y/o factor de células madre (SCF) (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2, u otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Están incluidas en la invención las combinaciones de los mismos.

25 La expresión "agente citotóxico" como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya a isótopos radiactivos (por ejemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

35 Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la evolución del ciclo celular (en un momento distinto que la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL®, e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden hasta la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13.

45 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocesina, carcelesina y bicelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de mecloretamina óxido, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, calicheamicina, en especial calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarcinostatina y cromóforos antibióticos enedina cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomocina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomocina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomocina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL®) y deoxidoxorubicina, epirubicina, esorubicina,

idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinoslatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de gallio; hidroxiourea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etil-hidrácida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretán; vindesina (EI-DISINE®), FILDESIN®); dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas modificadas por ingeniería genética por albúmina de paclitaxel (ABRAXANETM) y doxotaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VEL-BAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviación para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviación para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También están incluidos en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y con frecuencia están en la forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo entero. Estos pueden ser ellos mismos hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (MSRE), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (RNRE); agentes que funcionan suprimiendo o bloqueando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (HLH) tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasas que inhiben a la enzima aromatasas, los que regulan la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®), y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKILID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo de nucleósido citocina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación anormal de células, tales como, por ejemplo, PKC alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia génica; por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (un inhibidor dual de molécula pequeña de la tirosina cinasa de ErbB-2 y EGFR conocido también como GW572016); inhibidores COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX®); bencenosulfonamida de 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "citocina" es un término genérico para proteínas que libera una población celular y que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, monocinas, y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Están incluidas entre las citocinas las hormonas de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana N-metionilo, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas tales como la hormona foliculo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factores de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E); factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF); factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF, por ejemplo, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD); integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-alfa; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF alfa y TGF beta; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonia (CSF) tales como CSF de macrófago (M-

CSF); CSF de granulocitos-macrófago (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-30; secretoglobina/uteroglobina; oncostatina M (OSM); un factor de necrosis tumoral tal como TNF alfa o TNF beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se utiliza en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de origen natural o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

El término “profármaco” como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un precursor o una forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con los fármacos parentales y es capaz de ser activada o convertida enzimáticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos opcionalmente sustituidos que contienen fenoxiacetamida o profármacos opcionalmente sustituidos que contienen fenilacetamida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un “factor o agente angiogénico” es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento celular endotelial, la estabilidad de los vasos sanguíneos, y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia VEGF, PIGF, familia PDGF, familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos TIE (angiopoyetinas), efrinas, ANGPTL3, ANGPTL4, etc. Incluiría también factores que aceleran la cicatrización de heridas, tales como hormona de crecimiento, factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF- α y TGF- β . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera los factores angiogénicos); y, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003).

Un “agente anti angiogénesis” o “inhibidor de la angiogénesis” se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhiben la angiogénesis, la vasculogénesis, o la permeabilidad vascular inconveniente, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF, anticuerpos para receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Los agentes anti angiogénesis también incluyen inhibidores de la angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore, *Ann. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 que enumera la terapia antiangiogénica en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera los factores antiangiogénicos); y, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 enumera los agentes antiangiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

La expresión “agente inmunosupresor” como se utiliza en el presente documento se refiere a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario del mamífero que está siendo tratado en el presente documento. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citocinas, que regulan de forma negativa o suprimen la expresión de autoantígenos, o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de tales agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (véase la Patente de Estados Unidos n.º 4.665.077); fármacos antiinflamatorios no esteroides (FAINE); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides tales como cortisol o aldosterona, agentes antiinflamatorios tales como inhibidor de la ciclooxigenasa, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrieno; antagonistas de purinas tales como azatioprina o micofenolato de mofetilo (MMF); agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoides; por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato (oral o subcutáneo); hidroxicloroquina; sulfasalazina; leflunomida; anticuerpos de citocinas o de receptores de citocinas que incluyen anticuerpos anti interferón alfa, beta, o gamma, anticuerpos anti factor de necrosis tumoral alfa (infliximab o adalimumab), inmunoadhesina anti TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti factor de necrosis tumoral beta, anticuerpos anti interleucina-2 y anticuerpos anti receptor de IL-2; anticuerpos anti LFA-1, que incluyen anticuerpos anti CD11a y anti CD18; anticuerpos anti L3T4; globulina heteróloga anti linfocito; anticuerpos pan T, preferentemente anticuerpos anti CD3 o anti CD4/CD4a: péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3; (documento WO 1990/08187 publicado el 26 de julio 26 de 1990); estreptocinas; TGF-beta; estreptodornasa; ARN

o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de linfocitos T (Cohen *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.114.721); fragmentos del receptor de linfocitos T (Offner *et al.*, Science, 251: 430-432 (1991); documento WO 1990/11294; laneway, Nature, 341: 482 (1989); y documento WO 1991/01133); y anticuerpos de receptor de células T (documento EP 340.109) tales como T10B9.

5 Ejemplos de “fármacos antiinflamatorios no esteroideos” o “FAINE” son ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, indometacina, sulindae, tolmetina, que incluyen sales y derivados de los mismos, etc.

10 La “patología” de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprenden los bien conocidos del paciente. Para el cáncer, esto incluye, pero sin limitación, crecimiento celular anormal o no controlado, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células colindantes, liberación de citocinas u otros productos secretores en niveles anormales, supresión o empeoramiento de la respuesta inflamatoria o inmunitaria, etc.

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

20 “Transportadores” como se utiliza en el presente documento incluye transportadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia el transportador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponado. Los ejemplos de transportadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

30 Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos, y/o tensioactivos que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un polipéptido Bv8 o anticuerpo para él) a un mamífero. Comúnmente, los componentes de liposoma están dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

35 Una “molécula pequeña” se define en el presente documento como que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

40 Una “alteración de aminoácido” se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Las alteraciones ejemplares incluyen inserciones, sustituciones y deleciones. Una “sustitución de aminoácido” se refiere al reemplazo de un resto de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada con otro resto de aminoácido distinto.

45 Un “reemplazo” de resto de aminoácido se refiere a un resto de aminoácido que reemplaza o sustituye otro resto de aminoácido en una secuencia de aminoácidos. El resto de reemplazo puede ser un resto de aminoácido de origen natural o de origen no natural.

50 Una “inserción de aminoácido” se refiere a la introducción de uno o más restos de aminoácido en una secuencia de aminoácidos predeterminada. La inserción de aminoácido puede comprender una “inserción de péptido” en cuyo caso un péptido que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos mediante enlace(s) peptídico(s) se introduce en la secuencia de aminoácidos predeterminada. Cuando la inserción de aminoácido implica inserción de un péptido, el péptido insertado puede generarse mediante mutagénesis al azar de forma tal que tenga una secuencia de aminoácidos que no exista en la naturaleza. Una alteración de aminoácido “adyacente a una región hipervariable” se refiere a la introducción o sustitución de uno o más restos de aminoácido en el extremo N terminal y/o C terminal de una región hipervariable, de forma tal que por lo menos uno de los restos de aminoácidos insertado o de reemplazo forme un enlace peptídico con el resto de aminoácido N terminal o C terminal de la región hipervariable en cuestión.

60 Un “resto de aminoácido de origen natural” es uno que codifica el código genético, en general seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparragina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val).

65 Un “resto de aminoácido que no es de origen natural” en el presente documento es un resto de aminoácido distinto los restos de aminoácidos de origen natural enumerados anteriormente, que son capaces de unirse de forma covalente a restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los ejemplos de restos de aminoácidos que no son de origen natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de restos de aminoácidos tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991). Para generar tales restos

de aminoácidos que no son de origen natural, pueden utilizarse los procedimientos de Noren *et al.* Science 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, citado anteriormente. Brevemente, estos procedimientos implican la activación química de un ARNt supresor con un resto de aminoácido que no es de origen natural, seguido de la transcripción y la traducción del ARN *in vitro*.

5 Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo con una “alta afinidad” es un anticuerpo que tiene una K_D , o constante de disociación, en el intervalo nanomolar (nM) o mejor. Una K_D en el “intervalo nanomolar o mejor” se puede indicar por X nM, en donde X es un número menor de aproximadamente 10.

10 La expresión “fago filamentosos” se refiere a una partícula viral capaz de presentar un polipéptido heterogéneo en su superficie, e incluye, pero sin limitación, fl, fd, Pf1 y M13. Los fagos filamentosos pueden contener un marcador de selección tal como tetraciclina (por ejemplo, “fd-tet”). Son bien conocidos para los expertos en la materia diversos sistemas de presentación de fagos filamentosos (véase, por ejemplo, Zacher *et al.* Gene 9: 127-140 (1980), Smith *et al.* Science 228: 1315-1317 (1985); y Parmley y Smith Gene 73: 305-318 (1988)).

15 El término “selección” se utiliza para referirse a los múltiples ciclos de procedimientos de exploración en la identificación y aislamiento de fagos que portan compuestos, tales como anticuerpos, con una alta afinidad y especificidad por una diana.

20 La expresión “ARN de interferencia pequeño (ARNip)” se refiere a los ARN bicatenarios pequeños que interfieren con la expresión génica. Los ARNip son un intermediario de la interferencia de ARN, procedimiento en el que el ARN bicatenario silencia genes homólogos. Los ARNip normalmente están comprendidos por dos ARN bicatenarios de aproximadamente 15-25 nucleótidos de largo que forman un dúplex, que pueden incluir protuberancia(s) monocatenaria(s). El procesamiento del ARN bicatenario por un complejo enzimático, por ejemplo por polimerasas,
25 da como resultado la escisión del ARN bicatenario para producir los ARNip. Un complejo de silenciamiento de ARN de interferencia (ARNi) utiliza la hebra antisentido para guiar la escisión del ARNm, promoviendo de este modo la degradación del ARNm. Para silenciar un gen específico utilizando los ARNip, por ejemplo en una célula de mamífero, se selecciona la región de emparejamiento de las bases para evitar la complementariedad fortuita con un ARNm no relacionado. Se han identificado en la técnica complejos de silenciamiento de ARNi, tales como, por
30 ejemplo, por Fire *et al.*, Nature 391: 806-811 (1998) y McManus *et al.*, Nat. Rev. Genet. 3(10): 737-47 (2002).

La expresión “ARN de interferencia (ARNi)” se utiliza en el presente documento para referirse a un ARN bicatenario que da como resultado la degradación catalítica de ARNm específicos, y así pueden utilizarse para inhibir/disminuir la expresión de un gen particular.

35 Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para efectuar resultados terapéuticos (que incluyen preventivos) beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones.

40 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “célula”, “línea celular”, y “cultivo celular” se utilizan indistintamente y todas de tales designaciones incluyen progenie. Por lo tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen a las células y cultivos material objeto principales obtenidas de las mismas sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que no toda la progenie puede ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a las mutaciones deliberadas o involuntarias. El término “progenie” se refiere a cualquiera y toda la descendencia de cada generación posterior a una célula o línea celular originalmente
45 transformada. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica según la explorada en la célula transformada originalmente. En donde se pretendan designaciones distintas, estará claro a partir del contexto.

50 La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación es determinable fácilmente por alguien con las habilidades habituales en la materia, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sales. En general, sondas más largas necesitan temperaturas mayores para el apareamiento apropiado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación en general depende de la capacidad del ADN desnaturizado para reaparearse cuando las hebras complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de identidad
55 deseado entre la sonda y la secuencia hibridizable, mayor es la temperatura relativa a la que puede utilizarse. Como resultado, se deduce que mayores temperaturas relativas tenderán a hacer las condiciones de la reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas no tanto. Para detalles y explicación adicionales sobre la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

60 Las “condiciones de alta rigurosidad”, como se define en el presente documento, se identifican como las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado; cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente de desnaturización; formamida al 50 % (p/p) con seroalbumina bovina al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3)
65 emplean formamida al 50 %, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8),

5 pirofosfato de sodio al 0,1 %, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sometido a tratamiento con ultrasonidos (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2x (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1x que contiene EDTA a 55 °C.

10 Las “condiciones de rigurosidad moderada” se pueden identificar como describe Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen incubación durante una noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida al 20 %, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10 %, y ADN de esperma de salmón sometido a tratamiento con ultrasonidos desnaturalizado 20 mg/ml seguido del lavado de los filtros en SSC 1x a aproximadamente 37-50 °C. El experto reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de la sonda y similares.

15 B. Descripción detallada

15 La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el reconocimiento de que Bv8 desempeña un papel importante en los acontecimientos celulares y moleculares que conducen a la resistencia de los tumores al tratamiento, que incluye la administración de por lo menos un antagonista de VEGF, tal como un anticuerpo anti VEGF. La invención adicionalmente se basa en el reconocimiento de que la expresión de Bv8 es exquisitamente sensible a G-CSF, y así está ligada a un mecanismo homeostático principal implicado en la regulación de la diferenciación y producción de neutrófilos.

20 La publicación de Patente US 2007/0264193 A1 presentada el 28 de marzo de 2007, describe una correlación entre la incorporación de células hematopoyéticas derivadas de médula ósea y el desarrollo de resistencia tumoral al tratamiento anti VEGF. El sistema inmunitario incluye células hematopoyéticas, las cuales incluyen eritrocitos, linfocitos, y células del linaje mieloide. Estos tipos celulares derivan todos de las mismas células madre pluripotentes. En un adulto, la hematopoyesis se produce en la médula ósea, en donde las células madre se dividen de forma no frecuente para producir más células madre (autorrenovación) y diversas células progenitoras comprometidas. Son las células progenitoras comprometidas las que producirán células hematopoyéticas en respuesta a factores reguladores específicos. Estos factores reguladores los producen principalmente las células estromales circundantes y otros tejidos e incluyen, por ejemplo, factores estimulantes de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), interleucina 3 (IL3), CSF de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF), CSF de macrófagos (M-CSF), y factor STEEL. Se ha sugerido que las alteraciones de los sistemas inmunitarios en los pacientes de cáncer contribuyen a la incapacidad o capacidad reducida del sistema inmunitario para montar un ataque satisfactorio frente al cáncer, permitiendo así la evolución del crecimiento tumoral. Véase, por ejemplo, Gabrilovich *et al.*, Antibodies to Vascular Endothelial Growth Factor Enhance the Efficacy of Cancer Immunotherapy by Improving Endogenous Dendritic Cell Function, *Clinical Cancer Research* 5: 2963-2970 (1999). Los factores que producen los tumores pueden conducir a mielopoyesis anormal y pueden conducir a la supresión de la respuesta inmunitaria para el tumor. Véase, por ejemplo, Kusmartsev y Gabrilovich, Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother.* 51: 293-298 (2002).

45 Estudios recientes han implicado de forma directa a las células mieloides CD11b+Gr1+ en la mediación de la resistencia a la terapia anti VEGF (Shojaei, F., *et al.*, *Nature Biotechnol* 25: 911-20 (2007)), y documento US 2007/0264193 A1. La familia CD11/CD18 está estructural y genéticamente relacionada con una familia de integrinas más grande de receptores que modula las interacciones adhesivas celulares, que incluyen; embriogénesis, adhesión a sustratos extracelulares, y diferenciación celular (Hynes, R. O., *Cell* 48: 549-554 (1987); Kishimoto *et al.*, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989); Kishimoto *et al.*, *Cell* 48: 681-690 (1987); y, Ruoslahti *et al.*, *Science* 238: 491-497 (1987)). Las integrinas son una clase de heterodímeros que se extienden por toda la membrana que comprenden una subunidad α en asociación no covalente con una subunidad β . Las subunidades β en general son capaces de asociarse con más de una subunidad α y los heterodímeros que comparten una subunidad β común se han clasificado como subfamilias dentro de la población de integrinas (Larson y Springer, *Structure and function of leukocyte integrins*, *Immunol. Rev.* 114: 181-217 (1990)).

55 Se ha encontrado que las moléculas de integrina de la familia CD11/CD18, y sus ligandos celulares, median diversas interacciones célula-célula, en especial en inflamación. Se ha demostrado que estas proteínas son críticas para las funciones de adhesión en el sistema inmunitario (Kishimoto *et al.*, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989)). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales para LFA-1 bloquean la adhesión de leucocitos a las células endoteliales (Dustin *et al.*, *J. Cell. Biol.* 107: 321-331 (1988); Smith *et al.*, *J. Clin. Invest.* 83: 2008-2017 (1989)) e inhiben la activación de linfocitos T (Kuypers *et al.*, *Res. Immunol.*, 140: 461 (1989)), la formación del conjugado necesaria para la destrucción de CTL específica de antígeno (Kishimoto *et al.*, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989)), la proliferación de linfocitos T (Davignon *et al.*, *J. Immunol.* 127: 590-595 (1981)) y la destrucción de células NK (Krensky *et al.*, *J. Immunol.* 131: 611-616 (1983)).

65 La familia CD11/CD18 de moléculas receptoras de adhesión comprende cuatro glucoproteínas de superficie celular altamente relacionadas; LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), p150.95 (CD11c/CD18) y (CD11d/CD18). Cada uno de estos heterodímeros tiene una cadena α exclusiva (CD11a, b, c o d) y la cadena β invariable (CD18).

Las integrinas CD18, localizadas en los leucocitos, pueden unirse a la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que se expresa en el endotelio vascular y otras células, mediando de este modo la adhesión y la migración transendotelial leucocitaria. LFA-1 está presente en la superficie de todos los leucocitos maduros a excepción de un subconjunto de macrófagos, y se considera la principal integrina linfoide. La expresión de Mac-1, p150.95 y CD11d/CD18 está localizada de forma predominante en las células del linaje mieloides (que incluye neutrófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos). CD11b +Gr1+ son marcadores también encontrados en las células mieloides. Se ha sugerido que el equilibrio entre las células mieloides maduras e inmaduras es un indicio de cáncer y en crecimiento tumoral progresivo el equilibrio cambia hacia las células mieloides inmaduras con una disminución y función de las células dendríticas. Véase, por ejemplo, Kusmartsev y Gabrilovich, *Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression*. *Cancer Immunol Immunother*. 51: 293-298 (2002). El cambio del equilibrio, por ejemplo, mediante la diferenciación de las células mieloides inmaduras en ratones que tienen tumor, mejoró el efecto de las vacunas para el cáncer. Véase, Kusmartsev *et al.*, *All-trans-Retinoic Acid Eliminates Immature Myeloid Cells from Tumor-bearing Mice and Improves the Effect of Vaccination*. *Cancer Research* 63: 4441-4449 (2003). También se observó que en pacientes de cáncer, el nivel de VEGF en la circulación correlacionaba con un número creciente de células mieloides inmaduras. Véase, Almand *et al.*, *Clinical significance of defective dendritic cells differentiation in cancer*. *Clin. Cancer Res.* 6: 1755 (2000).

Se ha demostrado que la movilización y activación de las células mieloides CD11b+Gr1+ puede dar como resultado la resistencia al tratamiento anti VEGF. También se ha demostrado que las células mieloides CD11b+Gr1+ obtenidas de la médula ósea de ratones que tienen tumor pueden conferir resistencia en tumores al tratamiento anti VEGF y que el medio acondicionado de resistentes a anti VEGF (pero no de tumores sensibles a anti VEGF) estimulaba la migración de células CD11b+Gr1+.

Los datos experimentales divulgados en el presente documento demuestran que Bv8 regula la movilización de células CD11b+Gr1+ desde la médula ósea durante el desarrollo del tumor, y también promueve de forma local la angiogénesis tumoral. Por consiguiente, Bv8 es una diana prometedoras para el tratamiento de tumores resistentes al tratamiento con antagonistas de VEGF.

Los datos divulgados en el presente documento también indican que la expresión de Bv8 es exquisitamente sensible a G-CSF, y por lo tanto está ligada a un mecanismo homeostático principal implicado en la regulación de la diferenciación y la producción de neutrófilos. Debido a este papel más amplio que desempeña Bv8 en la patología de tipos no tumorales de angiogénesis mediada por células inflamatorias, Bv8 es también en general una diana prometedoras para la inhibición de la angiogénesis mediada por células inflamatorias no deseada.

35 C. Preparación de anticuerpos anti Bv8 que actúan como inhibidores de la angiogénesis tumoral

Los anticuerpos identificados mediante los ensayos de unión y actividad descritos en el presente documento se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen técnicas de la tecnología del ADN recombinante.

40 i) Preparación del antígeno

Se pueden utilizar inmunógenos para generar anticuerpos, antígenos solubles o fragmentos de los mismos, de forma opcional conjugados a otras moléculas. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, se pueden utilizar como inmunógenos fragmentos de estas (por ejemplo el dominio extracelular de un receptor). Como alternativa, pueden utilizarse como el inmunógeno las células que expresan la molécula transmembrana. Tales células se pueden obtener de una fuente natural (por ejemplo líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que hayan sido transformadas mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán obvios para los expertos en la materia.

50 (ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se generan preferentemente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R₁N = C = NR, donde R y R₁ son distintos grupos alquilo.

Los animales se inmunizaron frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde se les da a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre y se ensaya el título de anticuerpos en el suero. Los animales reciben una dosis de refuerzo hasta que el título se

estabiliza. Preferentemente, el animal recibe una dosis de refuerzo con el conjugado del mismo origen, pero conjugado a una proteína distinta y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento distinto. También se pueden preparar los conjugados en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. También, se utilizan de forma adecuada agentes agregantes tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

5

(iii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el método del hibridoma que describió primero Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos del ADN recombinante (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, se inmuniza como se describe anteriormente en el presente documento para generar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

10

15

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

20

Las células de mieloma preferentes son las que se fusionan de forma eficaz, sostienen una producción de anticuerpo estable de alto nivel en las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma murinas, tales como las obtenidas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles del Centro de Distribución Células del Instituto Salk, San Diego, Calif. USA, y de las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. USA. También se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales las líneas celulares de mieloma de ser humano y de heteromieloma ratón-humano (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

25

30

Se ensaya la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno en el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales que producen las células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

35

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución límite y cultivar mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

40

Los anticuerpos monoclonales que secretan los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero, por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

45

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse de forma específica a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, los cuales se transfectan después en células hospedadoras tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otra forma no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle a continuación.

50

55

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de fagotecas de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990).

60

Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y de ser humano, respectivamente, utilizando fagotecas. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos de ser humano de alta afinidad (en el rango de nM) mediante la redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir fagotecas muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de

65

anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.

Normalmente tales polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación de antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tenga especificidad por un antígeno distinto.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos una fuente que no es de ser humano introducidos en él de. Estos restos de aminoácidos que no son humanos con frecuencia reciben el nombre de restos "importados", los que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de las CDR o la CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo de ser humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que esencialmente menos que un dominio variable de ser humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie que no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables de ser humano, ligeros y pesados, a utilizar en la preparación de los anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el así llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable de ser humano conocidas. La secuencia de ser humano que más se aproxima a la del roedor es entonces aceptada como el armazón de ser humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método utiliza un armazón particular obtenido de la secuencia consenso de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada para todos los anticuerpos de ser humano. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados distintos (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Adicionalmente, es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de la alta afinidad por el antígeno y de otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y de diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de las inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar y combinar restos de FR del destinatario e importar secuencias de forma tal que se consigan las características del anticuerpo deseadas, tales como afinidad aumentada por los antígenos diana. En general, los restos de CDR están directamente y la mayoría esencialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno

Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos de ser humano en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región que une la cadena pesada (J.sub.H) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal, da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto génico de inmunoglobulinas de línea germinal de ser humano en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos de ser humano después de la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7: 33 (1993); y Duchosal *et al.* Nature 355: 258 (1992). También se pueden obtener anticuerpos de ser humano de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Vaughan *et al.* Nature Biotech 14: 309 (1996)). La generación de anticuerpos de ser humano a partir de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos se describe adicionalmente a continuación.

(v) Fragmentos de anticuerpo

Para la producción de fragmentos de anticuerpos se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse de forma directa mediante hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). En otra realización como se describe en el ejemplo a continuación, el F(ab')₂ se forma utilizando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')₂. De acuerdo con otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para los expertos. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión por lo menos dos epítopos distintos, en donde los epítopos normalmente son de antígenos distintos. Aunque tales moléculas normalmente solo se unirán a dos epítopos distintos (es decir, anticuerpos biespecíficos, AcB), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos están abarcados por esta expresión cuando se utiliza en el presente documento. Los ejemplos de AcB incluyen aquellos con un brazo dirigido frente a Bv8 y otro brazo dirigido frente a VEGF o EG-VEGF.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen distintas especificidades (Millstein *et al.*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estas hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo distintas, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es más bien engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991). De acuerdo con una estrategia distinta, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Es preferente tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de por menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado rendimientos altos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

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

De acuerdo con otra estrategia descrita en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferente comprende por lo menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de las cadenas laterales grandes se crean sobre la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero por sobre otros productos finales no queridos tales como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se han propuesto tales anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmunitario contra células no queridas (Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/200373).

5 Los anticuerpos del heteroconjugado se pueden preparar utilizando cualquiera de los métodos de entrecruzamiento convenientes. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se divulgan en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando unión química. Brennan *et al.*, Science 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que se escinden anticuerpos intactos de forma proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados después se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB después se reconvierte al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

20 Los fragmentos Fab'-SH también pueden recuperarse de forma directa de *E. coli*, y se pueden acoplar de forma química para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó de forma separada a partir de *E. coli* y se sometió al acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

25 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos distintos mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol, 152: 5368 (1994).

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

(vii) Modificación por ingeniería genética de la función efectora

45 Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de modo que se potencie la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden introducir restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación en esta región de enlaces disulfuro intercadena. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o de destrucción de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse utilizando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, se puede modificar por ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y pueda tener de este modo capacidades de lisis por complemento y ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

(viii) Fusiones anticuerpo-epítipo de unión al receptor de recuperación

60 En ciertas realizaciones de la invención, puede ser conveniente utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración tumoral, por ejemplo. En este caso, puede ser conveniente modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, incorporando un epítipo de unión a receptor de recuperación en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una etiqueta peptídica que después se fusiona al fragmento de anticuerpo en el extremo o en la mitad, por ejemplo, por síntesis de ADN o peptídica).

El epítipo de unión a receptor de recuperación preferentemente constituye una región en la que uno o más restos de aminoácido de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferentemente, se transfieren tres o más restos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3, o V.sub.H, o más de una de tales regiones, del anticuerpo. Como alternativa, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o a la región VL, o ambas, del fragmento de anticuerpo.

(ix) Otras modificaciones covalentes de anticuerpos

Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen dentro del ámbito de la presente invención. Ellas se pueden hacer por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Se introducen en la molécula otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo haciendo reaccionar los restos de aminoácidos elegidos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o con los restos N o C terminal. Los ejemplos de modificaciones covalentes se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.534.615.

Un tipo preferente de modificaciones covalentes del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a diversos polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la manera indicada en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden al anticuerpo descrito en el presente documento conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Está disponibles diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Por ejemplo, se pueden conjugar a anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos BCNU, estreptozaicina, vincristina, 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288, descrito en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, espermicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296), etc. (véase también la definición de agentes quimioterapéuticos en el presente documento).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Está disponible diversos isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados o de fragmentos de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb , ^{111}In , isótopos radiactivos de Lu, etc. Cuando el conjugado se utiliza para diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de gammagrafías, por ejemplo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{123}I , o un marcador de espín para la formación de imágenes para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro

Las radiomarcas, u otras marcas, se pueden incorporar en el conjugado de modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{111}In se pueden acoplar en el péptido a través de un resto cisteína. El itrio-90 se puede acoplar a través de un resto lisina. Se puede utilizar para incorporar yodo-123 el método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Common. 80: 49-57). Véase, por ejemplo, Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989) que describe otros métodos en detalle.

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

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan utilizando diversos agentes acoplantes de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoilo) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil) etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.* Science 238: 1098 (1987). El ácido triaminapentaacético de

1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un conector inestable en ácido; conector sensible a peptidasa, conector fotoinestable, conector dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

Como alternativa, se puede preparar una proteína de fusión que comprende el anti VEGF, y/o el anticuerpo anti proteína de la invención y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado ya sea adyacentes una a la otra o separadas por una región que codifica un péptido conector que no deshace las propiedades deseadas del conjugado.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo está conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento tumoral, en el que se administra al paciente el conjugado anticuerpo-receptor, seguido de la eliminación de la circulación del conjugado no unido utilizando un agente clarificante y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo un radionúclido). En determinadas realizaciones, está formado un inmunconjugado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

La invención proporciona un anticuerpo de la invención que está conjugado a una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló primero a partir del arbusto del África del este *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como ésteres de maitansinol y de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos 4.151.042). Se divulgan el maitansinol sintético y derivados y análogos de los mismos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.137.230.; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317,821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533

Un anticuerpo de la invención se puede conjugar a una molécula maitansinoide sin disminuir de forma significativa la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de las células diana sin afectar de forma negativa la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que potencie la citotoxicidad con respecto al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no de patente a las que se hace referencia anteriormente en el presente documento. En una realización, los maitansinoides son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de unión conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide, que incluyen, por ejemplo, los divulgados en la Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables en ácido, grupos fotoinestables, grupos peptidasa inestables, o grupos esterasa inestables, como se divulga en las patentes anteriormente identificadas, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter.

Se pueden preparar conjugados del anticuerpo y el maitansinoide utilizando diversas proteínas bifuncionales acopladas a agentes tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes acoplantes típicos incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridilditio) (SPP) para proporcionar una unión disulfuro.

El conector puede estar acoplado a la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, se puede formar una unión éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 teniendo un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 teniendo un grupo hidroxilo. La unión se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

Otros inmunconjugados de interés comprenden un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas de calicheamicina. La familia calicheamicina de antibióticos es capaz de producir roturas del ADN bicatenario en concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia calicheamicina, véanse las

Patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas para la American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de calicheamicina que se pueden utilizar, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos para American Cyanamid anteriormente mencionadas). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo puede conjugarse es QFA, que es un antifolato. La calicheamicina y QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

10 (x) Generación de anticuerpos a partir de fagotecas de anticuerpos sintéticos

Se describe en el presente documento un método para generar y seleccionar anticuerpos nuevos utilizando una estrategia de presentación de fagos exclusiva. La estrategia implica la generación de fagotecas de anticuerpos sintéticos basadas en el diseño de templado de armazón único de suficientes diversidades dentro de los dominios variables, la presentación de los polipéptidos teniendo los dominios variables diversificados, la selección de anticuerpos candidatos con alta afinidad para dirigirse al antígeno, y el aislamiento de los anticuerpos seleccionados.

Los detalles de los métodos de presentación de fagos se pueden encontrar publicados, por ejemplo, en el documento WO03/102157, publicado el 11 de diciembre de 2003.

En un aspecto, las bibliotecas de anticuerpos descritas en el presente documento se pueden generar mutando las posiciones accesibles a disolvente y/o ampliamente diversas en por lo menos una CDR de un dominio variable del anticuerpo. Se pueden mutar algunas o todas las CDR utilizando los métodos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, puede ser preferente generar diversas bibliotecas de anticuerpos mutando las posiciones en CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una biblioteca única, o mutando las posiciones en CDRL3 y CDRH3 para formar una biblioteca única, o mutando las posiciones en CDRL3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una biblioteca única.

Se puede generar una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, que tenga mutaciones en las posiciones accesibles a disolventes y/o altamente diversas de CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Se puede generar otra biblioteca que tenga mutaciones en CDRL1, CDRL2 y CDRL3. También, estas bibliotecas se pueden utilizar conjuntamente con las demás para generar miembros del par de unión con las afinidades deseadas. Por ejemplo, después de uno o más ciclos de selección de las bibliotecas de cadena pesada por la unión a un antígeno diana, se puede reemplazar una biblioteca de cadena ligera en la población de miembros del par de unión de cadena pesada para ciclos adicionales de selección para aumentar la afinidad de los miembros del par de unión.

Preferentemente, una biblioteca se crea mediante sustitución de los aminoácidos originales con aminoácidos variantes en la región CDRH3 de la región variable de la secuencia de cadena pesada. La biblioteca resultante puede contener una pluralidad de secuencias de anticuerpo, en las que la diversidad de secuencias se halla principalmente en la región CDRH3 de la secuencia de la cadena pesada.

En un aspecto, la biblioteca se crea en el contexto de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5, o de la secuencia de los aminoácidos del armazón de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5. Preferentemente, la biblioteca se crea mediante la sustitución de por lo menos los restos 95-100a de la cadena pesada con aminoácidos que codifica el conjunto del codón *DVK*, en el que el conjunto del codón *DVK* se utiliza para codificar un conjunto de aminoácidos variantes para cada una de estas posiciones. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₇. En algunas realizaciones, se crea una biblioteca sustituyendo los restos 95-100a con los aminoácidos que codifican los conjuntos de codones *DVK* y *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₆ (*NNK*). En otra realización, se crea una biblioteca sustituyendo por lo menos los restos 95-100a con los aminoácidos que codifican los conjuntos de codones *DVK* y *NNK*. Un ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*DVK*)₅ (*NNK*). Otro ejemplo de un conjunto de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia (*NNK*)₆. De acuerdo con el criterio descrito en el presente documento un experto en la técnica puede determinar otros ejemplos de secuencias de oligonucleótido adecuadas.

En otra realización, se utilizan distintos diseños CDRH3 para aislar miembros del par de unión de alta afinidad y para aislar miembros del par de unión para diversos epitopos. El intervalo de longitudes de la CDRH3 generada en esta biblioteca es de 11 a 13 aminoácidos, a pesar de que se pueden generar longitudes distintas de esta. Se puede expandir la diversidad de H3 utilizando los conjuntos de codones *NNK*, *DVK* y *NVK*, así como la diversidad más limitada en el N y/o el C terminal.

También se puede generar diversidad en las CDRH1 y CDRH2. Los diseños de las diversidades de CDR-H1 y H2 siguen la estrategia de orientarse a imitar el repertorio de anticuerpos naturales como se ha descrito, con una modificación que tiene como objetivo la diversidad más estrechamente ajustada a la diversidad natural que el diseño anterior.

Para la diversidad en CDRH3, se pueden construir múltiples bibliotecas de forma separada, con distintas longitudes de H3, y después combinarlas para seleccionar miembros de par de unión para los antígenos diana. Las múltiples bibliotecas se pueden agrupar y clasificar utilizando selección en soporte sólido y los métodos de clasificación en solución como se describe de forma previa y en el presente documento a continuación. Se pueden emplear múltiples estrategias de clasificación. Por ejemplo, una variación implica la clasificación sobre una diana unida a un sólido, seguido de la clasificación por una etiqueta que pueda estar presente en el polipéptido de fusión (por ejemplo etiqueta anti gD) y seguido de otra clasificación sobre la diana unida a un sólido. Como alternativa, las bibliotecas se pueden clasificar primero sobre la diana unida a una superficie sólida, después los miembros del par de unión eluidos se clasifican utilizando unión de fase en solución con concentraciones decrecientes del antígeno diana. La utilización de combinaciones de distintos métodos de clasificación proporciona la minimización de la selección solo de secuencias altamente expresadas y proporciona la selección de varios clones de alta afinidad distintos.

Se pueden aislar de las bibliotecas miembros del par de unión de alta afinidad por el antígeno diana. La limitación de la diversidad en la región H1/H2 disminuye la degeneración en aproximadamente 10^4 a 10^5 veces, y permitir más diversidad de H3 proporciona más miembros del par de unión de alta afinidad. La utilización de bibliotecas con distintos tipos de diversidad en CDRH3 (por ejemplo utilizando DVK o NVT) proporciona el aislamiento de miembros del par de unión que se puedan unir a distintos epítomos de un antígeno diana.

Se ha descubierto que proporcionando diversidad limitada en la cadena ligera se puede mejorar adicionalmente la afinidad de los miembros del par de unión aislados de las bibliotecas agrupadas como se describe anteriormente. En esta realización la diversidad de la cadena ligera se genera en CDRL1 como sigue: RDT codifica la posición del aminoácido 28; RKT codifica la posición del aminoácido 29; RVW codifica la posición del aminoácido 30; ANW codifica la posición del aminoácido 31; THT codifica la posición del aminoácido 32; de manera opcional, CTG codifica la posición del aminoácido; en CDRL2: KBG codifica la posición del aminoácido 50; AVC codifica la posición del aminoácido 53; y de manera opcional GMA codifica la posición de aminoácido 55; en CDRL3: TMT o SRT o ambas codifican la posición del aminoácido 91; DMC codifica la posición del aminoácido 92; RVT codifica la posición de aminoácido 93; NHT codifica la posición del aminoácido 94; TWT o YKG o ambas codifican la posición de aminoácido 96.

En otra realización, se genera una biblioteca o bibliotecas con diversidad en las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3. En esta realización, se genera diversidad en CDRH3 utilizando diversas longitudes de las regiones H3 y utilizando los conjuntos de codones principales XYZ y NNK o NNS. Se pueden formar las bibliotecas utilizando oligonucleótidos individuales y agrupados, o se pueden agrupar los oligonucleótidos para formar un subconjunto de bibliotecas. Las bibliotecas de esta realización se pueden clasificar frente a diana unida a sólido. Los clones aislados a partir de múltiples clasificaciones se pueden explorar según la especificidad y la afinidad utilizando ensayos de ELISA. Para la especificidad, los clones se pueden explorar frente a los antígenos diana deseados así como otros antígenos que no sean diana. Después se pueden explorar los miembros del par de unión para el antígeno diana según la afinidad en un ensayo de ELISA de competición de unión en solución, o en un ensayo de competición puntual. Los miembros del par de unión de alta afinidad se pueden aislar a partir de la biblioteca utilizando los conjuntos de codones XYZ preparados como se describe anteriormente. Estos miembros del par de unión se pueden producir fácilmente como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en cultivos celulares de alto rendimiento.

En algunas realizaciones, puede ser conveniente generar bibliotecas con una mayor diversidad de longitudes de la región CDRH3. Por ejemplo, puede ser conveniente generar bibliotecas con regiones CDRH3 que varían desde aproximadamente 7 a 19 aminoácidos.

Los miembros del par de unión de alta afinidad aislados de las bibliotecas de estas realizaciones se producen fácilmente en cultivos celulares bacterianos y eucariotas con un alto rendimiento. Los vectores se pueden diseñar para eliminar secuencias fácilmente, tales como etiquetas gD, la secuencia del componente de la proteína de cubierta viral, y/o para añadir en la región constante secuencias para proporcionar la producción con un alto rendimiento de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno.

Se puede combinar una biblioteca con mutaciones en la CDRH3 con una biblioteca que contiene versiones variantes de otras CDR, por ejemplo CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 y/o CDRH2. Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, se combina una biblioteca de CDRH3 con una biblioteca de CDRL3 creada en el contexto de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 29, 30, 31, y/o 32 utilizando conjuntos de codones predeterminados. En otra realización, se puede combinar una biblioteca con mutaciones para el CDRH3 con una biblioteca que comprenda dominios variables de cadena pesada de CDRH1 y/o CDRH2 variantes. En una realización, la biblioteca de CDRH1 se crea con la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 30, 31, 32 y 33. Se puede crear una biblioteca de CDRH2 con la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 50, 52, 53, 54, 56 y 58 utilizando los conjuntos de codones predeterminados.

(xi) Variantes de anticuerpo

Los anticuerpos nuevos generados a partir de las fagotecas se pueden modificar adicionalmente para generar mutantes de anticuerpo con propiedades físicas, químicas y/o biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental. Cuando el ensayo utilizado es un ensayo de actividad biológica, el mutante de anticuerpo preferentemente tiene una actividad biológica en el ensayo de elección que es por lo menos aproximadamente 10 veces mejor, preferentemente por lo menos aproximadamente 20 veces mejor, más preferentemente por lo menos aproximadamente 50 veces mejor, y a veces por lo menos aproximadamente 100 veces o 200 veces mejor, que la actividad biológica del anticuerpo parental en ese ensayo. Por ejemplo, un mutante de anticuerpo anti Bv8 preferentemente tiene una afinidad de unión por Bv8 que es por lo menos aproximadamente 10 veces más fuerte, preferentemente por lo menos aproximadamente 20 veces más fuerte, más preferentemente por lo menos aproximadamente 50 veces más fuerte, y a veces por lo menos aproximadamente 100 veces o 200 veces más fuerte, que la afinidad de unión del anticuerpo parental.

Para generar el mutante de anticuerpo, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del agente parental. Como alternativa, o además de, se pueden introducir una o más alteraciones (por ejemplo sustituciones) de los restos de la región marco conservada en el anticuerpo parental, en donde estas dan como resultado la mejora en la afinidad de unión del mutante de anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Los ejemplos de restos de la región marco conservada para modificar incluyen los que se unen directamente al antígeno de forma no covalente (Amit *et al.* (1986) *Science* 233: 747-753); interactúan con/efectúan la conformación de una CDR (Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917); y/o participan en la interfaz $V_L - V_H$ (documento EP 239 400B1). En determinadas realizaciones, la modificación de uno o más de tales restos de la región marco conservada da como resultado una potenciación de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Por ejemplo, se pueden alterar desde aproximadamente uno a aproximadamente cinco restos del armazón.

En ocasiones, esto puede ser suficiente para producir un mutante de anticuerpo adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso en donde ninguno de los restos de la región hipervariable se han alterado. Normalmente, sin embargo, el mutante de anticuerpo comprenderá alteraciones de la región hipervariable adicionales.

Los restos de la región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, en especial en donde la afinidad de unión inicial del anticuerpo parental es tal que tales mutantes de anticuerpo producidos aleatoriamente se pueden explorar fácilmente.

Un procedimiento útil para generar tales mutantes de anticuerpo se denomina "mutagénesis por exploración de alanina" (Cunningham y Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085). Aquí, uno o más de los restos de la región hipervariable se reemplazan por resto(s) alanina o polialanina para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. Después, este/estos resto(s) de la región hipervariable que demuestra/demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones, se perfeccionan introduciendo mutaciones adicionales u otras mutaciones en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no necesita estar predeterminada. Los mutantes de ala producidos de este modo se exploran por su actividad biológica, como se describe en el presente documento.

Normalmente se comenzaría con una sustitución conservativa tal como las mostradas a continuación bajo del título "sustituciones preferentes". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión), después se introducen cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la siguiente tabla, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se exploran los productos.

Sustituciones preferentes:

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gin; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg

Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Incluso se llevan a cabo modificaciones más sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre (a) el mantenimiento de la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos a base de las propiedades de las cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófobo: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutro hidrófilo: cys, ser, thr, asn, gln;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromático: trp, tyr, phe.

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

En otra realización, los sitios seleccionados para la modificación se maduran en afinidad usando presentación de fagos (véase anteriormente).

20 Las moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida), mutagénesis por PCR, mutagénesis por inserción de un casete de una versión mutante o no mutante del anticuerpo parental preparada anteriormente. El método preferente para preparar mutantes es la mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488).

25 En determinadas realizaciones, el mutante de anticuerpo tendrá solo un único resto de la región hipervariable sustituido. En otras realizaciones, habrán sido sustituidos dos o más restos de la región hipervariable, por ejemplo, desde aproximadamente dos a aproximadamente diez sustituciones de la región hipervariable.

30 Normalmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos el 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos o de similitud con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente de por lo menos el 80 %, más preferentemente de por lo menos el 85 %, más preferentemente de por lo menos el 90 %, y muy preferentemente de por lo menos el 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta

35 secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo a base de las propiedades de las cadenas laterales comunes, véase anteriormente) a los restos del anticuerpo parental, después del alineamiento de las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para conseguir el

40 máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones, o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas, en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable, se considerarán como afectando la identidad o similitud de secuencia.

Después de la producción del mutante de anticuerpo, se determina la actividad biológica de la molécula con respecto al anticuerpo parental. Como se indica anteriormente, esto puede implicar la determinación de la afinidad

45 de unión y/o de otras actividades biológicas del anticuerpo. En un método descrito en el presente documento, se prepara un grupo de mutantes de anticuerpo y se explora la afinidad de unión por el antígeno o un fragmento del mismo. De manera opcional se somete uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados a partir de esta exploración inicial, a uno a más ensayos adicionales de actividad biológica para confirmar que el/los mutante(s) de anticuerpo con afinidad de unión potenciada son realmente útiles, por ejemplo para estudios preclínicos.

50

El/los mutante(s) de anticuerpo así seleccionados se pueden someter a modificaciones adicionales, que con frecuencia dependen del uso pretendido del anticuerpo. Tales modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, la fusión a polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes tales como las detalladas a continuación. Con respecto a las alteraciones de la secuencia de aminoácidos, las modificaciones ejemplares se detallan anteriormente. Por ejemplo, también se puede sustituir cualquier resto de cisteína no implicado en la manutención de la conformación apropiada del mutante de anticuerpo, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento anómalo. A la inversa, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de mutante de aminoácidos tiene un patrón de glucosilación alterado. Esto se puede conseguir mediante la delección de uno o más residuos de carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo, y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. Normalmente, la glucosilación de los anticuerpos está unida en N o unida en O. Unido en N se refiere al acoplamiento del residuo de carbohidrato en la cadena lateral de un resto asparragina. La secuencias tripéptido asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del residuo de carbohidrato a la cadena lateral de la asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. Glucosilación unida en O se refiere al acoplamiento de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva a cabo de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripéptido anteriormente descritas (para los sitios de glucosilación unidos en N). La alteración también se puede hacer mediante la adición en, o sustitución de, uno o más restos serina o treonina de la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación unidos en O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato acoplado allí. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa acoplada a una región Fc del anticuerpo, se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc) en el carbohidrato acoplado a la región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y la Patente de Estados Unidos n.º 66.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con por lo menos un resto galactosa en el oligosacárido acoplado a la región Fc del anticuerpo se notifican en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véase, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.), referentes a anticuerpos con carbohidrato alterado acoplado a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

Las variantes de glucosilación preferentes en el presente documento comprenden una región Fc, en la que una estructura de carbohidrato acoplada a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen función ADCC mejorada. De forma opcional, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácido en ellas que adicionalmente mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de restos de Eu). Los ejemplos de publicaciones concernientes a anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento US 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO 2005/053742; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen a las células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 A1 Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.* (en especial en el Ejemplo 11), y líneas celulares genosuprimidas, tales como las células CHO genosuprimidas para el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, (Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)).

(xii) Producción recombinante de anticuerpos

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica al anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse de forma específica a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción (por ejemplo como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.534.615).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura, o de eucariotas superiores descritas anteriormente. Los

procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque también son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están comúnmente disponibles varios de otros géneros, especies, y cepas, y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles de forma pública diversas cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 del NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV de *Bombyx mori*, y tales virus se pueden utilizar como el virus descrito en el presente documento, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, ha sido mayor el interés en las células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha transformado en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario de ser humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol Reprod 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino de ser humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón de perro (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata parda (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón de ser humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado de ser humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma de ser humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos, y se cultivan en medio nutriente convencional, modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras utilizadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Son adecuados para el cultivo de células hospedadoras medios disponibles de forma comercial tales como medio de Ham F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, se puede utilizar como medio de cultivo para las células hospedadoras cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; 5.122.469; documento WO 90/03430, documento WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos n.º Re 30.985. Cualquiera de estos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir cualquiera de otros complementos necesarios, a las concentraciones apropiadas, que serían conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán obvias para alguien con las habilidades habituales en la materia.

- 5 Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos particulados, ya sean células hospedadoras o células lisadas, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, en general primero se concentran los sobrenadantes de tales sistemas de expresión utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible de forma comercial, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las etapas precedentes se puede incluir un inhibidor de proteasas tal como PMSF para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.
- 10 La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, con la cromatografía de afinidad siendo la técnica de purificación preferente. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede utilizar la proteína A para purificar anticuerpos que estén basados en las cadenas pesadas γ , $\gamma 2$, $\gamma 4$ de ser humano (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ de ser humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual está acoplado el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, es útil para la purificación la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.). También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recuperar.

D. Usos de los antagonistas de Bv8

- 30 Los antagonistas de Bv8 de la presente invención se pueden utilizar solos o en combinación con otro(s) agente(s) terapéutico(s) para la inhibición de la angiogénesis, en particular la angiogénesis dependiente de células inflamatorias y/o la tumorigénesis.
- 35 Las dianas principales para los métodos de tratamiento de la presente invención son tumores que han demostrado o se conoce que son resistentes al tratamiento con antagonistas de VEGF, en particular anticuerpos anti VEGF.
- 40 Los ejemplos de enfermedades y trastornos a tratar mediante los métodos de la presente invención incluyen trastornos neoplásicos, tales como los descritos en el presente documento bajo los términos "cáncer" y "canceroso". Las afecciones no neoplásicas que son susceptibles de tratamiento con los antagonistas de la invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, hipertrofia no deseada o anormal, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, edema a partir de infarto de miocardio, retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas que incluyen retinopatía de prematuridad, fibroplasia retrolenticular, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización de injerto de la córnea, rechazo de injerto de la córnea, neovascularización retinal/coroidea, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroide (que incluyen enfermedad de Grave), trasplante de la córnea y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, daño pulmonar agudo/ARDS, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, infusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo asociado con ictus agudo/traumatismo craneal cerrado/traumatismo), inflamación sinovial, formación de cataratas en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad ovárica poliquística, endometriosis, enfermedades relacionadas con la acumulación de líquidos en el 3er espacio (pancreatitis, síndrome del compartimento, quemaduras, enfermedades intestinales), fibroides uterinos, trabajo de parto prematuro, inflamación crónica tales como EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrótico, crecimiento de masa tisular no deseado o anormal (no cáncer), obesidad, crecimiento de la masa tisular adiposa, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome Osler-Weber, fibroplasias retrolenticulares de granuloma piogénico, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada con pericarditis), y efusión pleural.
- 60 La invención proporciona terapias combinadas en las que un antagonista de Bv8 de la presente invención se administra en combinación con otra terapia. El tratamiento de combinación incluye de forma específica la administración en el presente documento de un antagonista de Bv8 en combinación con un anticuerpo anti VEGF o fragmento de unión a antígeno del mismo. Además, los antagonistas de Bv8 en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, agente de reducción de células mieloides, agentes o agentes terapéuticos antineoplásicos, agentes antiangiogénesis, o un producto terapéutico antineovascularización para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas, tales como angiogénesis dependiente de células inflamatorias o tumorigénesis.

En una realización, la afección neoplásica o no neoplásica se caracteriza por el trastorno patológico asociado con la angiogénesis anormal o no deseada que es resistente al tratamiento con antagonista de VEGF. Los antagonistas de la invención se pueden administrar en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para los fines, ya sea en la misma composición o como composiciones separadas. Como alternativa, o de forma adicional, se pueden administrar múltiples antagonistas, agentes y/o agonistas de la invención.

La administración del antagonista y/o de los agentes se puede hacer de forma simultánea, por ejemplo, como una composición única o como dos o más composiciones distintas utilizando las mismas o distintas vías de administración. Como alternativa, o de forma adicional, la administración se puede hacer de forma secuencial, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, pueden estar presente entre las administraciones de dos o más composiciones, intervalos que varían desde minutos hasta días, semanas, meses. Por ejemplo, el antagonista de VEGF se puede administrar primero, seguido de un antagonista o agente distinto, por ejemplo, el agente de reducción de células mieloides (distinto de un antagonista VEGF). Sin embargo, también se contempla la administración simultánea, o la administración del antagonista o agente distinto primero.

Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos administrados estarán bajo el criterio del médico o del veterinario. La administración o ajuste de la dosificación se realiza para conseguir el máximo control de las afecciones a tratar. La dosis dependerá adicionalmente de tales factores como el tipo de agente terapéutico a utilizar y el paciente específico a tratar. Las dosificaciones adecuadas para el antagonista de VEGF son las usadas actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del antagonista de VEGF y los distintos antagonistas descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un inhibidor individual. El término "potencia" se refiere a una mejora en la eficacia de un agente terapéutico a su dosis común o aprobada. Véase también la sección titulada Composiciones Farmacéuticas en el presente documento.

La terapia antiangiogénica en relación con el cáncer es una estrategia de tratamiento del cáncer deseada para la inhibición del desarrollo de vasos sanguíneos del tumor, necesarios para proporcionar nutrientes para sostener el crecimiento tumoral. Debido a que la angiogénesis está implicada en el crecimiento tumoral primario y en la metástasis, el tratamiento antiangiogénico que proporciona la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en el sitio primario así como de prevenir la metástasis de los tumores en los sitios secundarios, permitiendo por lo tanto que otros agentes terapéuticos ataquen a los tumores. En una realización de la invención, el agente o producto terapéutico antineoplásico es un agente antiangiogénico. En otra realización, el agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico.

Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y son conocidos en la técnica, incluyendo los enumerados en el presente documento, por ejemplo, los enumerados en las Definiciones y en, por ejemplo, Carmeliet y Jain, *Nature* 407: 249-257 (2000); Ferrara et al, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3: 391-400 (2004); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003). Véase también, la Solicitud de Patente de Estados Unidos US20030055006. De acuerdo con la invención, se utiliza un antagonista de Bv8 de la invención en combinación con un anticuerpo (o fragmento) neutralizante anti VEGF. Otros antagonistas de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, fragmentos solubles del receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neutrofilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de las VEGFR tirosina cinasas (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas frente a VEGF o receptores de VEGF, variantes de antagonistas de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o de forma adicional, se pueden coadministrar al paciente de forma opcional dos o más inhibidores de la angiogénesis, además del antagonista de VEGF y otro agente de la invención. En determinada realización, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes antineoplásicos, en combinación con el agente de la invención, el antagonista de VEGF, y/o un agente antiangiogénesis.

En determinados aspectos de la invención, como se define en las reivindicaciones, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral de combinación con los antagonistas de Bv8 de la invención, incluyen otras terapias del cáncer (por ejemplo, tratamientos radiológicos (por ejemplo, que implican irradiación o administración de sustancias radioactivas), o quimioterapia, tratamiento con los agentes antineoplásicos enumerados en el presente documento y conocidos en la técnica, o combinaciones de los mismos). Como alternativa, o de forma adicional, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unan al mismo o dos o más antígenos distintos divulgados en el presente documento. En ocasiones, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente.

En determinados aspectos, la invención proporciona un método de bloqueo o de reducción del crecimiento tumoral resistente o del crecimiento de una célula cancerosa, administrando al paciente susceptible de, o diagnosticado con, cáncer, cantidades eficaces de un antagonista de VEGF y de un antagonista de la invención y uno o más agentes quimioterapéuticos. En los métodos de tratamiento combinado de la invención se puede utilizar diversos agentes quimioterapéuticos. En el presente documento, en "Definiciones", se proporciona una enumeración ejemplar y no limitante de los agentes quimioterapéuticos contemplados.

Como comprenderán los expertos en la materia, las dosis apropiadas de los agentes quimioterapéuticos en general estarán alrededor de las ya empleadas en las terapias clínicas en las que el producto quimioterapéutico se administra solo o en combinación con otros productos quimioterapéuticos. La variación en la dosificación probablemente se producirá, dependiendo de la afección a tratar. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recaída del crecimiento tumoral o la recaída del crecimiento de las células cancerosas. Recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de las células cancerosas se utiliza para describir un estado en el que los pacientes se someten a tratar con una o más de las terapia actualmente disponibles (por ejemplo, terapias del cáncer, tales como quimioterapia, terapia de radiación, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpo anti VEGF, en particular un régimen terapéutico convencional para el cáncer particular), no es clínicamente adecuado para tratar a los pacientes o los pacientes ya no están recibiendo algún efecto beneficioso de la terapia de forma tal que los pacientes necesitan terapia eficaz adicional. Como se utiliza en el presente documento, la frase también se puede referir a un estado del paciente "no sensible/resistente", por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia que sin embargo padecen efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En diversas realizaciones, un cáncer es recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células cancerosas en donde el número de células cancerosas no se ha reducido de forma significativa, o ha aumentado, o el tamaño tumoral no se ha reducido de forma significativa, o ha aumentado, o falla cualquier reducción adicional del tamaño o del número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son recaída de crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células cancerosas se puede hacer *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia del tratamiento sobre las células cancerosas, utilizando los significados aceptados en la técnica de "recaída" o "insensible" o "no sensible" en tal contexto. Un tumor resistente al tratamiento anti VEGF es un ejemplo de una recaída de crecimiento tumoral.

La invención proporciona métodos de bloqueo o de reducción de la recaída de crecimiento tumoral o de recaída del crecimiento de células cancerosas en un sujeto, administrando uno o más antagonistas de la invención para bloquear o reducir la recaída de crecimiento tumoral o la recaída del crecimiento de células cancerosas en el sujeto. En determinadas realizaciones, el antagonista se puede administrar después de un producto terapéutico del cáncer. En determinadas realizaciones, los antagonistas de la invención se administran de forma simultánea con terapia del cáncer, por ejemplo, quimioterapia. Como alternativa, o de forma adicional, la terapia de antagonista se alterna con otra terapia del cáncer, lo cual se puede realizar en cualquier orden. La invención también abarca métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para prevenir el inicio o la reaparición del cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. En general, el sujeto estuvo o está sometido actualmente a terapia del cáncer. De acuerdo con la invención, la terapia del cáncer es el tratamiento con un anticuerpo o fragmento neutralizante anti VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202; el documento EP 0666868B1; las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126. Popkov *et al*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004); y el documento WO200501235. Se pueden administrar agentes adicionales en combinación con el antagonista de VEGF y un antagonista de la invención para bloquear o reducir la recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de las células cancerosas, por ejemplo, véase la sección titulada Terapias de Combinación en el presente documento.

Los antagonistas de Bv8 se pueden administrar en combinación con uno o más agentes de reducción de células mieloides, que incluyen, pero sin limitación, productos terapéuticos que reducen la expresión de Gr1, la elastasa de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, las URCPG o las URRTP. Los agentes de reducción de células mieloides para su uso en combinación con los antagonistas de Bv8 de la presente invención incluyen de forma específica antagonistas de Gr1, antagonistas de CD11b, antagonistas de CD18, inhibidores de la elastasa, antagonistas de MCP-1, antagonistas de MIP-1 alfa, clodronato, solos o en cualquier combinación.

Además, los antagonistas de Bv8 se pueden administrar en combinación con agentes hormonales, de radiación y quimioterapéuticos resensibilizando de ese modo las células cancerosas a uno o más de estos agentes, que pueden después administrarse (o continuar administrándose) para tratar o controlar el cáncer, incluyendo para prevenir la metástasis.

La sensibilidad del tumor al tratamiento con un antagonista de VEGF se puede evaluar proporcionando una o más poblaciones celulares de prueba del sujeto que incluya células capaces de expresar una o más secuencias de ácido nucleico homólogas al ácido nucleico que codifica una URCPG, DRCPG, URRTP o DRRTP. La expresión de las secuencias se compara con una población celular de referencia. Se puede utilizar cualquier población celular de referencia, en tanto se conozca el estado de sensibilidad al antagonista de VEGF de las células en la población celular de referencia. Se puede realizar la comparación sobre las muestras de prueba y de referencia, medidas al mismo tiempo o en momentos temporalmente distintos. Un ejemplo de lo último es el uso de la información de expresión recopilada, por ejemplo, una base de datos de secuencias, que integra información sobre los niveles de expresión de secuencias conocidas en células cuyo estado de sensibilidad es conocido. En determinadas

realizaciones descritas en el presente documento, la población celular de referencia está enriquecida en células mieloides CD11b+Gr1+. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la población celular de referencia está enriquecida en células tumorales.

- 5 También se pueden identificar los tumores resistentes al tratamiento con antagonistas de VEGF utilizando los conjuntos de marcadores de diagnóstico proporcionados en la Patente de Estados Unidos Número 7.838.188 presentada el 28 de marzo de 2007. Por ejemplo, un conjunto de marcadores puede incluir dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, veinte o más, o el conjunto completo de moléculas. La molécula es un ácido nucleico
- 10 que codifica una proteína o una proteína con una expresión y/o actividad alterada, y se selecciona de las siguientes: Notch2, DMD8, MCP-1, ITGB7, G-CSF, IL-8R, MIP2, MSCA, GM-CSF, IL-1R, Meg-SF, HSP1A, IL-1R, G-CSFR, IL10-R1, Erb-2.1, Caveolina3, Semcap3, INTG4, THBSP-4, ErbB3, JAM, Eng, JAM, Eng, JAM-2, Pecam1, Tlr3, elastasa de neutrófilo, CD14, expi, IL-13R, LDLR, TLR-1, RLF, Endo-Lip, SOCS13, FGF13, IL-4R, THBS1, Crea7, Acuaporina-1, SCF38, APOE, FABP, IL-11R, IL-1RII, IFN TM1, TNFRSF18, WNT5A, membrana transportadora
- 15 secretora 1, HSP86, EGFR, EphRB2, GPCR25, HGF, Similar a angiopoyetina-6, Eph-RA7, Semaforina Vlb, Neurotrofina 5, Claudina-18, MDC15, ECM, ADAMTS7B, NCAM-140, Fibronectina tipo III, WIP, CD74, ICAM-2, Jagged1, Itga4, ITGB7, TGF-BII-R, TGFb IEP, Smad4, BMPR1A, CD83, Dectina-1, CD48, E-selectina, IL-15, Supresor de la señalización de citocina 4, Cyt4, CX3CR1, IGF2, HSP9A, FGF18, ELM1, Ledgfa, receptor eliminador tipo A, lectinas tipo C de macrófago, Pigr3, SRT-1 de macrófago, receptor acoplado a proteína G, ScyA7,
- 20 IL-1R2, proteína inducible por IL-1, IL-1beta, Precursor de ILIX, TGF-B, FIZZ1, Wfs1, TP 14A, EMAP, SULF-2, Matriz extracelular 2, CTFG, TFPI, XCP2, Ramp2, ROR-alfa, Efrina B1, similar a SPARC 1 y Semaforina A. En una realización descrita en el presente documento, se proporciona un anticuerpo que detecta la proteína. En una realización, las moléculas se obtienen de células CD11b+Gr1+ e incluyen, por ejemplo, IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1 y Crea7. En otra realización, las moléculas se obtienen de tumores resistentes e incluyen, por
- 25 ejemplo, MSCA, MIP2, IL-8R, G-CSF, IL10-R2, THBSP-4, y JAM-2

E. Composiciones farmacéuticas y administración

- 30 Los antagonistas de Bv8, tales como anticuerpos anti Bv8, de la presente invención, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un período de tiempo, mediante administración por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o por inhalación, y/o subcutánea.

- 35 En determinadas realizaciones, el tratamiento de la invención implica la administración combinada de un antagonista de Bv8 y de un anticuerpo anti VEGF o fragmento del mismo.

- En una realización, están presentes agentes antineoplásicos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes antiangiogénesis distintos, uno o más agentes quimioterapéuticos, etc. La invención también contempla la
- 40 administración de múltiples inhibidores, por ejemplo, múltiples anticuerpos para el mismo antígeno o múltiples anticuerpos para proteínas distintas de la invención. En una realización, en el presente documento se administra con el antagonista de Bv8 un cóctel de distintos agentes quimioterapéuticos. La administración combinada incluye coadministración, que utiliza formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y/o la administración consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, el anticuerpo agonista de VEGF o fragmento puede preceder, seguir,
- 45 alternarse con la administración del antagonista de Bv8, anticuerpo o fragmento, o puede proporcionarse de forma simultánea con los mismos. En una realización, hay un período de tiempo durante el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen de forma simultánea sus actividades biológicas.

- Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del agente de la invención dependerá
- 50 del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el inhibidor se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al inhibidor, y el criterio del médico responsable. El inhibidor se administra de forma adecuada al paciente de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. En un régimen de terapia de combinación, las composiciones de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente sinérgica. Como
- 55 se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz es tal que la administración de una composición de la invención y/o la coadministración del anticuerpo o fragmento anti VEGF y del anticuerpo o fragmento anti Bv8 da como resultado la reducción o inhibición de la enfermedad o afección que se tiene como objetivo. El efecto de la administración de una combinación de agentes puede ser aditivo. En una realización, el resultado de la administración es un efecto sinérgico. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad del
- 60 anticuerpo o fragmento antagonista de VEGF o del anticuerpo o fragmento antagonista de Bv8 y de forma opcional un agente de reducción de células mieloides, un agente quimioterapéutico y/o un agente antineoplásico, necesaria para reducir o eliminar de forma sinérgica o significativa las afecciones o los síntomas asociados con una enfermedad particular.

- 65 Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de antagonista de Bv8, antagonista de VEGF, agente de reducción de células mieloides, un agente

quimioterapéutico, o un agente antineoplásico, es una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o

5 más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, se pueden utilizar otros regímenes de dosificación. Normalmente, el médico administrará una molécula(s) de la invención hasta que se alcanza una dosificación/dosificaciones que proporcione los efectos biológicos necesarios. La evolución de la terapia de la invención se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

10 Por ejemplo, la preparación y programas de dosificación para los inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, anticuerpos anti VEGF, tales como AVASTIN® (Genentech), se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o el experto en la materia los puede determinar de forma empírica. En otro ejemplo, la preparación y programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o el experto en la materia los puede determinar de forma empírica. La preparación y programas de dosificación para la quimioterapia también están descritos en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992).

20 La eficacia del tratamiento de la invención se puede medir mediante diversos criterios utilizados comúnmente en la evaluación de trastornos neoplásicos y no neoplásicos. Por ejemplo, los tratamientos del cáncer se pueden evaluar mediante, por ejemplo, pero sin limitación, regresión tumoral, contracción del peso o tamaño tumoral, tiempo de evolución, duración de la supervivencia, supervivencia sin evolución, tasa de respuesta global, duración de la respuesta, calidad de vida, expresión y/o actividad de proteínas. Debido a que los agentes antiangiogénicos descritos en el presente documento tienen como diana la vasculatura tumoral y no necesariamente las propias

25 células neoplásicas, representan una clase única de fármacos antineoplásicos, y por lo tanto pueden necesitar medidas y definiciones de respuesta clínica a los fármacos exclusivas. Por ejemplo, la contracción tumoral de más del 50 % en un análisis 2-dimensional es el límite convencional para declarar una respuesta. Sin embargo, los inhibidores de la invención pueden provocar inhibición de la propagación metastásica sin contracción del tumor primario, o simplemente pueden ejercer un efecto tumoristático. Por consiguiente, se pueden emplear estrategias para determinar la eficacia de la terapia, que incluyen por ejemplo la medida de marcadores de plasma o urinarios de la angiogénesis, y la medida de la respuesta a través de la formación de imágenes radiológicas.

También se describe y proporciona en el presente documento un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos o el diagnóstico de trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente, una etiqueta y un prospecto de envase. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de diversos materiales tales como vidrio o plástico. En una realización, el recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga una tapa perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es modulador de VEGF y por lo menos un segundo agente activo es un agente de reducción de células mieloides y/o un agente quimioterapéutico. La etiqueta sobre, o asociada con, el recipiente, indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa.

45 Los detalles adicionales de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

50 MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de la expresión génica mediante Taqman™

Se preparó ARN de tejidos o de células utilizando el kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen). Para los análisis por PCR (Taqman™) en tiempo real se utilizaron 50 ng de ARN total por reacción. Para Bv8 de ratón/ser humano y EG-VEGF/receptor de Bv8 1 (PKR-1/EG-VEGFR1, R-1), sirvió como control ARN de testículos (BD Biosciences). Para EG-VEGF/receptor de Bv8 2 de ratón/ser humano (PKR-2/EG-VEGFR2, R2), sirvió como el control de tejidos hipotálamo o cerebro completo (BD Biosciences). Las reacciones se ejecutaron en el modo de Emulación 9600 del sistema de 7500 Real time PCR (Perkin Elmer) (Applied Biosystems) y la cuantificación absoluta con la curva estándar se utilizó con el programa informático Sequence Detection System (SDS). El nivel de expresión de cada gen se cuantificó adicionalmente en la misma muestra frente al gen constitutivo RPL19. Para confirmar la expresión de VEGFR-1, VEGF-2, EG-VEGF17Bv8 R1 y EG-VEGF/Bv8 R2 en las células endoteliales asociadas al tumor, se realizaron RT-PCR convencionales utilizando el sistema de RT-PCR Titan One Tube™ (Roche) y el tamaño correcto de los productos finales se comprobó en gel de agarosa al 2 % (Invitrogen). La secuencia de los cebadores de Taqman™ es como sigue:

Bv8 de ratón directo: GCA TGA CAG GAG TCA TCA TTT T (SEQ ID NO: 7), inverso: AAA TGG CAG GAT ATC AGG AAA (SEQ ID NO: 8), sonda: AAA CTT TAT TTG TAA CCC AAA GGT CTA ATG TAA ATG GA (SEQ ID NO: 9);

5 Bv8 de ser humano directo: ATG GCA CGG AAG CTA GGA (SEQ ID NO: 10), inverso: GCA GAG CTG AAG TCC TCT TGA (SEQ ID NO: 11), sonda: TGC TGC TGG ACC CTT CCT AAA CCT (SEQ ID NO: 12);

Bv8 R1 de ratón directo: CAG CGC ACA TGA AGA CTT G (SEQ ID NO: 13), inverso: GTC ATC TTC GGT TTC CTG AGT (SEQ ID NO: 14), sonda: TCC AGG CAG CAC CCC TGA TG (SEQ ID NO: 15);

Bv8 R2 de ratón directo: GAA CTC CAC GTG AGC GCA (SEQ ID NO: 16), inverso: GGG TCC CAT GTT GAT GAT GC (SEQ ID NO: 17), sonda: CTC CCT GAT ACA CAC CAG CCC ACC TG (SEQ ID NO: 18);

10 Bv8 R1 de ser humano directo: CTG GAA GGC TTC TTA CAA TGG (SEQ ID NO: 19), inverso: GGC ATC CCA ATT GTC TTG A (SEQ ID NO: 20), sonda: TCC AGG TCT GCA CTG GAC TTA CCG (SEQ ID NO: 21);

Bv8 R2 de ser humano directo: TCA CCA TCG TTC GTG ACT TC (SEQ ID NO: 22), inverso: AGA AGG CAG TGA GGT AGT GCTT (SEQ ID NO: 23), sonda: TCC TTC ACG AAC ACA GTG GGG AA (SEQ ID NO: 24);

15 RPL19 de ratón directo: AGG TCA AAG GGA ATG TGT TCA AA (SEQ ID NO: 25), inverso: CCT TGT CTG CCT TCA GCT TGT (SEQ ID NO: 26), sonda: ACA AGC GCA TCC TCA TGG AGC ACA TC (SEQ ID NO: 27);

RPL19 de ser humano directo: CGC AAG CGC CGT GAA (SEQ ID NO: 28), inverso: GGT CTC TTC CTC CTT GGA TAA AGT C (SEQ ID NO: 29), sonda: CCA GGC CAA GAA GGA GGA GAT CAT CA (SEQ ID NO: 30);

Citometría de flujo

20 Se recolectaron células mononucleares de MO (CMMO), células de SP y células tumorales de ratones implantados con varios tipos tumorales. Se lisaron los glóbulos rojos utilizando tampón de lisis Ack (Cambrax, MA), seguido de tinción con anti CD11b de ratón en rata (Myletmy Biotech, CA) conjugado a APC y anti Gr1 de ratón en rata (BD Biosciences, CA) conjugado a PE. Para excluir células muertas, se añadió 7AAD (actinomicina D; BD Biosciences CA) a todas las muestras antes de la adquisición de los datos en el instrumento FACSCalibur.

Ensayos de migración

30 Se aislaron las CMMO de ratones desnudos Beige sin tratamiento previo y la población CD11b+Gr1+ se clasificó utilizando microesferas de CD11b (Miltenyi Biotech, CA), de acuerdo con los protocolos proporcionados por el fabricante. Se tiñó con anti CD11b-APC y anti Gr1-PE una alícuota de las células clasificadas para asegurar la pureza (100 %) de las células CD11b+Gr1+. Para el ensayo de migración, $2,0 \times 10^5$ células se sembraron en placa en la cámara superior de transpocillos (Corning Incorporated, Nueva York). Las cámaras inferiores contenían 600 μ l de medio (IMDM (Gibco BRL, CA) complementado con BIT (Cell Technologies, BC, Canadá STEM) que contenía BV8 de ser humano, anticuerpo de control, y VEGF recombinante murina en pocillos separados. Las células se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 9 horas y se evaluó la migración de las células CD11b+Gr1+ mediante el recuento de células en la cámara inferior.

Regulación de la expresión del gen *Bv8* en células MMO cultivadas

40 MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1p, MIP-2, bFGF, VEGF, GM-CSF, G-CSF, SDF-1 y TNF α de ratón recombinantes se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN). KC, IFN γ , Bv8 (Procineticina-2), IL-4, IL-10, 1L-13, TGF- β de ratón recombinantes eran de PeproTech Inc. (Rocky Hill, Nueva Jersey). Todas las citocinas se utilizaron a 10 ng/ml excepto VEGF y Bv8, las cuales se probaron a 50 ng/ml. Los medios condicionados se utilizaron a la dilución 1:3 (la concentración final de SFB fue del 0,17 %). Los datos se normalizaron frente al número total de células. Las células de MO se extrajeron de huesos de pata de ratón con DMEM que contenía SFB al 10 %. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en medio HBSS que contenía BSA al 0,2 % (endotoxina baja, Serologicals Corp. Norcross, GA). Se incubaron dos millones de células en placas de 24 pocillos con diversas citocinas durante 4 horas a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 %. Las células se transfirieron a tubos eppendorf, se centrifugaron y se lisaron con tampón de lisis de ARN (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluó la expresión de *Bv8* mediante Taqman™ con RPL19 (proteína ribosomal L19) como control génico interno. En algunos casos, las células CD11b+Gr1+ o CD11b-Gr1- de MO se obtuvieron utilizando clasificación por FACS.

55 Para analizar los efectos de los anticuerpos anti G-CSF sobre la expresión del gen *Bv8*, inducida por el entorno tumoral, se trataron las CMMO aisladas de ratones Balb/c desnudos durante 4 horas con lisados de tumores HM7 que se habían implantado en los ratones durante 24-36 horas o con tampón de control. Los lisados tumorales se preincubaron con una IgG policlonal neutralizante anti G-CSF en cabra (AF-414-NA, R&D Systems) o con IgG en cabra de control (R&D Systems) a diversas concentraciones durante 45 min antes de añadirlos a las CMMO. Se verificó la capacidad de la IgG anti G-CSF para bloquear G-CSF de ratón y de ser humano. La expresión de *Bv8* en las CMMO se evaluó después utilizando análisis de Taqman™. Para el estudio se utilizaron 9 animales y se analizaron los datos de 3 estudios independientes.

Recogida de medio condicionado por células tumorales

65 Se cultivaron células A673, HM7, HPAC y Calu6 en medio de cultivo hasta que alcanzaron la confluencia de ~90 %. Después se cambió el medio de cultivo a medio DMEM:F12 (50:50) que contenía SFB al 0,5 %. Las células TIB42

que crecían de forma exponencial a una densidad de 5×10^5 /ml se cambiaron a medio de DMEM:F12 que contenía SFB al 0,5 %. Después de tres días de incubación se recogió el medio condicionado. Se midió la viabilidad celular y el número total de células utilizando el analizador de viabilidad celular Vi-Cell™ XR (Beckman Coulter).

5 Ensayos de proliferación de células tumorales

Las células A673, HM7, HPAC y Calu6 se tripsinizaron y se lavaron en medio que contenía SFB al 0,5 % antes de la siembra en "Viewplaca" de 96 pocillos negra (Packard Bioscience Company, Meriden, CT). Las células se incubaron durante 3 días con diversas cantidades de Bv8 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ). Sirvió como un control positivo medio que contenía SFB al 10 %. La proliferación celular se evaluó por la incorporación de BrdU utilizando el kit Cell Proliferation ELISA (Roche).

Estudios de G-CSF y anti G-CSF *in vivo*

15 Se inyectaron por vía subcutánea ratones Balb/c de ocho semanas con 10 µg de G-CSF de ser humano recombinante (Neupogen, Amgen) de forma diaria durante ocho días consecutivos. A los animales de control se les proporcionó PBS. Al final del estudio, se tomaron muestras de MO, sangre entera y bazo para el análisis. Después de la interrupción de G-CSF se mantuvo durante dos días un grupo de animales. El recuento de neutrófilos se realizó utilizando un analizador de hematología basado en citometría de flujo automatizado, de alta resolución (Celldyn 3000). Los niveles de Bv8 en suero y en MO se midieron mediante ELISA.

Para determinar el papel de Bv8 en la movilización de células CD11b+Gr1+ inducida por G-CSF, ratones Balb/c desnudos recibieron dos dosis de anticuerpos anti Bv8 (5+5 mg/kg), con 12 horas de separación, seguido de G-CSF en ratón (R&D Systems; 2 µg/ratón) cuatro horas después de la segunda dosis de Acm. Como control positivo, se utilizó un Acm anti G-CSF de ratón en rata (Acm414, R&D Systems; 10 mg/ratón) proporcionado en el mismo intervalo que el anti Bv8, seguido de G-CSF de ratón. Después de seis horas, se extrajo sangre de los ratones y se determinó la frecuencia de las células CD11b+Gr1+ como se describe. Para determinar el papel de G-CSF en la regulación de la expresión de Bv8 en ausencia de tumor, se proporcionó a ratones Balb/c desnudos inyecciones i.p. diarias de IgG en rata de control (Genentech) o Acm anti G-CSF en rata (Acm414, R&D Systems, 10 µg/ratón) durante ocho días consecutivos. Se realizó la eutanasia a los animales y se extrajeron las proteínas totales de las CMMO. Los niveles de Bv8 se midieron por ELISA, como se describe. Para evaluar la importancia de G-CSF en la regulación de la expresión de Bv8 en tumores, se pretrataron ratones Balb/c desnudos con 10 µg de Acm anti G-CSF en rata o IgG en rata como se describe anteriormente, seguido después de 12 horas del implante con células HM7 (5×10^6 por ratón). Los controles se implantaron con Matrigel™ vacío. Después los animales recibieron la administración diaria de anticuerpos durante dos días. Cuarenta y ocho horas después del implante de Matrigel™ o de tumor, se les realizó la eutanasia a los ratones y se midieron los niveles de Bv8 en las CMMO como se describe anteriormente.

Generación y exploración de los anticuerpos neutralizantes anti BV8

40 Se generaron anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos frente a proteína Bv8 de ser humano recombinante. Los anticuerpos se exploraron utilizando dos ensayos independientes. Un ensayo se basó en la capacidad de la proteína Bv8 para inducir la proliferación de células endoteliales obtenidas de corteza suprarrenal bovina, como se describe (LeCouter *et al.*, 2003, citado anteriormente). El segundo ensayo se basaba en la capacidad de Bv8 para inducir una cascada de señalización en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban de forma estable cada uno de sus receptores. Brevemente, las células CHO que expresaban de forma estable el gen de la beta lactamasa bajo el promotor NFAT (Invitrogen) se cultivaron en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 %. Se transdujo ADNc de PKR1 o PKR2 de ser humano (Masuda, Y., *et al.*, citado anteriormente y Lin, D. C. *et al.*, citado anteriormente) en pMSCV-Higromicina. Las células que expresaban el transgén se seleccionaron en higromicina 500 mg/ml durante 2 semanas. Posteriormente, las células respondedoras se aislaron mediante clasificación por FACS por su capacidad de escindir el sustrato fluorescente basado en FRET, CCF4, después de 16 h de estimulación con Bv8 h, como sugería el fabricante. Los anticuerpos neutralizantes se identificaron por su capacidad de bloquear la expresión de beta-lactamasa que induce Bv8. Bv8h a 100-200 ng/ml durante 16 horas en presencia o ausencia de los anticuerpos monoclonales anti Bv8 de ratón purificados diversas concentraciones estimularon PKR1 o PKR2 beta-lactamasa de NFAT de CHO. Después de la estimulación, las células se incubaron con CCF4 durante 1 hora y se midió la fluorescencia con un lector de placa de 96 pocillos Envision™ (Perkin Elmer).

Para establecer de forma directa el papel de Bv8 durante la tumorigénesis, los inventores hicieron uso de los anticuerpos monoclonales (Acm) neutralizantes anti BV8. Se emplearon los Acm 3F1 y 2B9 murinos, que reaccionan de forma cruzada con Bv8 de ratón y de ser humano. Estos Acm se seleccionaron en base a su capacidad de inhibir la proliferación de células endoteliales de corteza suprarrenal estimulada por Bv8 (LeCouter *et al.*, Nature 412: 877-884 (2001)) y de inhibir la señalización en células CHO transfectadas con GPCR de Bv8. El Acm 2B9 inhibió como máximo ~ 70 % del efecto mitogénico de las proteínas Bv8 de ser humano o ratón, aunque el Acm 3F1 inhibió hasta el 50 %. Sin embargo, la combinación de los dos Acm, cada uno a la concentración de 5-10 µg/ml, bloqueó de forma completa los efectos mitogénicos que provocaba Bv8 de ser humano o ratón a 100 ng/ml. Los anticuerpos, probados solos o en combinación, no tuvieron efecto sobre la proliferación celular endotelial en condiciones basales o después

de la estimulación con la VEGF-A no relacionada estructuralmente o la EG-VEGF relacionada. También, ni los Acm anti Bv8 ni la propia Bv8 tuvieron algún efecto detectable sobre la proliferación de las líneas celulares de tumor probadas en este estudio, a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones (datos no mostrados).

- 5 Para determinar el régimen terapéutico más eficaz *in vivo*, en experimentos iniciales los inventores realizaron estudios de dosis-respuesta con los Acm 3F1 y 2B9, de forma individual o en combinación, en el modelo de A673. Como predijeron los datos *in vitro*, una combinación de los dos Acm fue más eficaz que un Acm único. La administración de 5 mg/kg de cada Acm dos veces a la semana consiguió un efecto inhibitorio máximo sobre el crecimiento tumoral. Por lo tanto, este régimen se utilizó en todos los experimentos de prueba de hipótesis
10 posteriores. Además del rhabdomyosarcoma A673, los inventores probaron modelos adicionales, que incluían las líneas celulares de ser humano HM-7, Jurkat, HPAC y Calu-6 y los linfomas de ratón EL-4 y TIB42.

Estudios de tumor *in vivo*

- 15 Las líneas celulares de tumor de ser humano Calu-6, A-673, JURKAT, HPAC y HM7, así como las líneas de linfoma de ratón EL4 y TIB42, se cultivaron en Ham F12, DMEM de baja glucosa 1:1, complementado con SFB al 10 % v/v, penicilina/estreptomicina al 1 % v/v, L-Gln 2 mM y Fungizone™ (Invitrogen™, CA) 1 µg/ml. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de aire al 95 %/CO₂ al 5 %. Para los experimentos de xenoinjerto de ratón, se resuspendieron las células tumorales a una concentración de 1×10^8 células/ml y se inyectaron por vía subcutánea
20 (100 µl/ratón) en el flanco dorsal de ratones Balb-c o beige desnudos inmunodeficientes XID (Harlan Sprague Dawley, IN). En los puntos de 24 o 48 horas después de la inoculación de las células tumorales, se inició la administración i.p. de los Acm anti Bv8, 2B9 y 3F1, a una dosis total de 10 mg/kg (5 mg/kg de cada Acm) (n=10). Como controles, los inventores emplearon el Acm anti ambrosía y el Acm anti VEGF G6.31 o B20 (Liang, W. C., *et al.*, J Biol Chem 281, 951-961 (2006)). A partir de ahí los ratones se trataron dos veces a la semana. Se calcularon
25 los volúmenes tumorales cada segundo día, utilizando las fórmulas de volumen elipsoide ($6 \times L \times A \times A$, donde L = largo, A = ancho, y A = alto) (Tomayko, MM y Reynolds, CP, Cáncer Chemother Pharmacol 24, 148 -154 (1989)). Para los análisis estadísticos de las diferencias entre los grupos, se realizó ANOVA unidireccional seguido del análisis por pareja Tukey HSD utilizando el programa informático JMP (SAS Institute Inc.). Se consideró significativo un valor de $p < 0,005$.

30

Análisis histológico e inmunohistoquímica

- Los tumores se fijaron en formalina tamponada neutra durante 24 horas antes de la inclusión en parafina. La tinción de H y E y la inmunohistoquímica se realizaron como se describió anteriormente (ref). Brevemente, la tinción
35 inmunohistoquímica con un monoclonal anti PLVAP de ratón MECA-32 (BD-Pharmingen) se realizó utilizando solución de recuperación de diana antígeno (DAKO) a 99 grados C a temperatura ambiente, durante 20 minutos cada uno. El anticuerpo primario se detectó de forma secuencial utilizando un anticuerpo secundario biotinilado (Vector), y reactivos Vectastain ABC Elite™. El producto de reacción se generó utilizando DAB potenciado con metal (Pierce Chemical, IL). Las secciones se contratiñeron ligeramente con hematoxilina, se deshidrataron, y se cubrieron con un cubreobjetos.

40

Construcción de los vectores de adenovirus

- Los vectores de adenovirus que codifican LacZ y VEGF_{164r} se describieron de forma previa (LeCouter *et al.*, 2001, citado anteriormente). Bv8r adenoviral se generó utilizando el sistema de vector adenoviral AdEasy XL™ (Stratagene). Bv8r adenoviral se generó utilizando el sistema de vector adenoviral AdEasy™ XL (Stratagene). El ADNc de Bv8r con una etiqueta 6xHis (SEQ ID NO: 36) en su extremo C se clonó entre los sitios XhoI y Hind III del vector pShuttle-CMV. El plásmido pShuttle-CMV-Bv8r resultante se recombinó con pAdEasy-1™ en BJ5183-AD-1, en una cepa competente para electroporación pretransformada con el esqueleto adenoviral. El plásmido de Bv8
50 adenoviral recombinante se transfeció después en células AD-293 para el empaquetado de las partículas virales. Las reservas de adenovirus se purificaron mediante gradiente de CsCl. El adenovirus se tituló utilizando el kit de titulación Adeno-X rapid™ (Clontech).

Aislamiento y caracterización de células endoteliales asociadas a tumor

55

- Las células endoteliales asociadas a tumor (CEAT) se aislaron utilizando un sistema de clasificación de esferas magnéticas (Miltenyi Biotech), esencialmente como se describió previamente (Hida *et al.*, Cancer Res. 64: 8249-8255 (2004)). Brevemente, se inyectaron células de linfoma de ratón TIB42 en el flanco dorsolateral de ratones beige desnudos hembra. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de ~1000 mm³, se escindieron, se trituraron y después de digirieron con colagenasa II (Worthington Biochemical Corporation). Después se filtraron las suspensiones celulares utilizando mallas de 100 µm a 40 µm. Para finalizar, las células CD31⁺ se clasificaron utilizando un anticuerpo FITC-CD31 (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CD31⁺ se sembraron en placas recubiertas de gelatina en presencia de medio EGM-2MV (Cambrex). Después de 24 horas en cultivo las células no adherentes CD31⁺ se retiraron lavando varias veces con PBS.

65

Para la RT-PCR, se extrajo ARN de las células cultivadas utilizando el minikit RNeasy™ (QIAGEN). Para los experimentos mostrados, se utilizaron 80 ng de ARN para cada reacción de 50 µl y el ADNc se amplificó durante 28 ciclos. Las secuencias de los cebadores están disponibles bajo solicitud.

- 5 Se privó de alimento a las células TIB42-CEAT durante 6 horas en medio basal complementado con BSA al 0,5 %. Después las células se estimularon con Bv8 de ser humano recombinante (200 ng/ml; PeproTech), Medio Completo (MC), VEGF (100 ng/ml; PeproTech) o BSA (al 0,5 %). Se recogieron los extractos celulares en los puntos de tiempo indicados. Los análisis de transferencia de Western de los extractos de las células TIB42-CEAT se realizaron utilizando el kit de anticuerpo PhosphoPlus p44/42 MAPK™ (Cell signaling). Para evaluar la consistencia y la reproducibilidad de este resultado, se analizó cada condición por duplicado y los experimentos se realizaron tres veces, con resultados similares.

- 15 Para la formación de conductos *in vitro*, las células TIB42-CEAT (pasajes 6-8) se privaron de alimento durante 5 h en medio sin suero. Después de esto, las células se recogieron y se resuspendieron en medio sin suero complementado con BSA al 5 % y se trataron con VEGF-A (100 ng/ml), Bv8 (200 ng/ml) o sin añadir algo (control). Para las pruebas de especificidad, Bv8 se incubó en presencia de los Acm anti Bv8 (10 µg/ml). Se sembraron 5×10^5 células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos prerrecubierta con Matrigel™ (BD Biosciences) y se evaluó la formación del conducto después de 36 horas.

20 Angiografía tomográfica microcomputerizada

- Los animales que tenían el tumor HM7 recibieron una inyección de 50 µl i.p. de heparina 10 minutos antes de realizar la eutanasia mediante inhalación de dióxido de carbono. La cavidad torácica se abrió, se hizo una incisión en el ápice de la cabeza, y se pasó una cánula de polietileno (di 0,58 mm, de 0,96 mm) a través del ventrículo izquierdo y se aseguró en la aorta ascendente con sutura de seda 5-0. Se perfundieron 17 ml de solución de nitroprusiato de sodio 0,1 mM en solución salina al 0,9 %, a una velocidad de 6 ml/min para proporcionar un estado de vasodilatación máxima y retirar sangre. Se preparó MICROFIL® (Carver, MA), un cromó-látex disponible de forma comercial, como recomendaba el fabricante y se perfundieron 17 ml a una velocidad de 2 ml/min. Se permitió que la mezcla de látex infundida polimerice a temperatura ambiente durante sesenta minutos antes de la disección de los tejidos de interés. Los tumores diseccionados se sumergieron en formalina tamponada neutra al 10 %.

- Los tumores se analizaron por imágenes con un sistema de tomografía microcomputerizada (Tmicro-C) de rayos x µCT40™ (SCANCO Medical, Basserdorf, Suiza). Los tumores se analizaron por imágenes con aceite de soja como medio de fondo. Las imágenes de Tmicro-C se generaron operando el tubo de rayos x a un nivel de energía de 45 kV, una corriente de 177 µA y un tiempo de integración de 300 milisegundos. Las imágenes axiales se obtuvieron en una resolución isotrópica de 16 µm.

- La red vascular y el tumor se extrajeron mediante una serie de etapas de procesamiento de imagen. Para extraer el volumen vascular (VV) se aplicaron a los datos de imágenes Tmicro-C volumétricos un umbral de intensidad de 1.195 Unidades Hounsfield (UH) y filtrado morfológico (erosión y dilatación). El volumen tumoral (VT) se extrajo a partir del fondo de un modo similar, con un umbral de intensidad de -8 UH. Se determinó la densidad vascular (VV/VT) a partir de la proporción de VV con respecto a VT. Los umbrales de intensidad vascular y tumoral se determinaron por inspección visual de los resultados de segmentación a partir de un subconjunto de muestras. Los análisis por ordenador se realizaron mediante un algoritmo de análisis de imágenes de uso interno escrito en C++ y Python, que empleó la biblioteca de programas informáticos de procesamiento de imágenes AVW (AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS). Las interpretaciones de la superficie tridimensional (3D) se crearon a partir de los datos de Tmicro-C con el uso de Analyze 6.0 (AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS), un paquete de programas informáticos de análisis de imágenes. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de programas informáticos estadísticos JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Las comparaciones grupales para las medidas de Tmicro-C (VV, VT, VV/VT) se evaluaron con la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se consideraron significativos los valores p menores de 0,05.

Purificación parcial de la proteína Bv8 y análisis de transferencia de Western del lisado de CMMO.

- 55 Se inyectó por vía subcutánea G-CSF de ser humano (10 µg/día, Amgen) y GM-CSFm (0,5 µg/día, PeproTech) por vía intraperitoneal en ratones Balb/c (n=20) de forma diaria durante 4 días, para expandir la población CD11b+GR1+. En el día 5 se aislaron las células de MO y el sedimento celular se resuspendió en 2 ml de Tritón X-100™ al 0,5 %. Después el lisado celular se forzó a pasar cuatro veces por una aguja de calibre 25, y se ajustó la concentración de sales a NaCl 50 mM. El extracto crudo se aplicó a una columna de heparina-Sepharose® (Hi-Trap, 1 ml) preequilibrada con Tris 20 mM pH 7,2, NaCl 50 mM. La columna se eluyó utilizando un gradiente lineal de dos etapas: NaCl 50 mM a 1 M, y después NaCl 1 M a 2 M en Tris 20 mM, pH 7,2. El caudal fue de 1 ml/min. Se controló la absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 1 ml se recogieron y se ensayaron para Bv8r utilizando ELISA y transferencia de Western. Para los análisis por transferencia de Western, se concentraron 4 veces 100 µl de las fracciones utilizando columnas de centrifugación Microcon YM-3® (Millipore), y después se cargaron en un SDS-PAGE al 4-20 % (Invitrogen). La transferencia se tiñó durante una noche utilizando una combinación de tres anticuerpos de hámster frente a Bv8r (2D3, 3B8 y 4E10) a una concentración total de 10 µg/ml en tampón de

bloqueo (PBST, Tween 20 al 0,1 % en PBS y leche desnatada al 5 %). Después de tres lavados, la transferencia se incubó con un anticuerpo en cabra anti IgG de hámster conjugado a peroxidasa de rábano picante (ImmunoResearch Laboratories), y después se reveló utilizando quimioluminiscencia potenciada más el Western Blot Detección System™ (GE Healthcare Bio-Science).

5

ELISA de Bv8 de ratón

Se recubrieron placas de micropocillos de 96 pocillos MaxiSorp® (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con anticuerpo 3F1 (un anticuerpo anti Bv8 de ser humano en ratón, que también se une a Bv8 de ratón) 1,0 mg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron con PBS que contenía polisorbato 20 al 0,05 % y se bloquearon con seroalbúmina bovina al 0,5 %, ProClin 300™ 100 ppm (Supelco, Bellefonte, PA) en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Después de que se hubieron lavado las placas, se añadieron a las placas los estándares de Bv8 de ratón (0,039-2,50 ng/ml en diluciones en serie con factor 2, Genentech) y las muestras (dilución mínima 1:10) en PBS que contenía seroalbúmina bovina al 0,5 %, polisorbato 20 al 0,05 %, Proclin 300® 10 ppm (Supelco, Bellefonte, PA) y NaCl 0,35 N (tampón de muestra). Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se retiró mediante una etapa de lavado. El anticuerpo unido a las placas se detectó añadiendo anticuerpo 4E10 biotinilado (un anticuerpo en hámster anti Bv8 de ratón, Genentech) seguido de estreptavidina-HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como sustrato. La reacción se finalizó añadiendo ácido fosfórico 1 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector apilador Titertek™ (ICN, Costa Mesa, CA). Las curvas de titulación de los estándares se ajustaron utilizando un programa de ajuste de curva de regresión de cuatro parámetros (Generitech). Los puntos de los datos que cayeron en el intervalo de la curva estándar se utilizaron para calcular las concentraciones de Bv8 de ratón en las muestras.

Este ensayo puede tolerar suero de ratón al 10 % y tampón de lisis al 10 % y tiene una sensibilidad de 0,39 ng/ml para las muestras de suero y de lisado de tejido. Es específico para Bv8. IgG1 de ser humano G6-31 anti VEGF, G-CSF de ser humano y VEGF de ser humano hasta 30 mg/ml, o EG-VEGF de ser humano hasta 5 mg/ml solo proporcionaron señal de fondo. Este ELISA también detecta Bv8 de ser humano pero con el 26 % o menos de eficacia. La presencia de 3F1 anti Bv8 hasta 14 ng/ml y de 2B9 anti Bv8 hasta 124 ng/ml no afectó de forma significativa la detección de Bv8 0,5 ng/ml en tampón de muestra.

30

RESULTADOS

Para determinar si el crecimiento tumoral en un sitio distante afecta a la expresión de Bv8 en la MO, se transplantaron células tumorales A673 y HM7 en ratones inmunodeficientes. Como se ilustra en la Figura 1a, el implante de ambos tumores dio como resultado el aumento significativo de los niveles de Bv8 en la MO mediante ELISA, en comparación con el implante de Matrigel™ vacío.

35

Para caracterizar la proteína Bv8 producida en las MO y validar el ELISA de los inventores, se sometieron lisados de células mononucleares de médula ósea (CMMO) de ratón a cromatografía de afinidad de heparina-sepharose. Como se ilustra en la Figura complementaria (en lo sucesivo C) 1a, Bv8 se unió fuertemente a la columna y se eluyó como un pico único en presencia de ~NaCl 0,4 M. Esto se confirmó mediante análisis por transferencia de Western, que demostró en las fracciones inmunorreactivas la presencia de la banda de ~9 kDa esperada (Figura C 1b).

40

Las CMMO constan de varios subconjuntos de células, principalmente del linaje mielóide y del linfóide. Para elucidar qué subconjunto de las CMMO está enriquecido en Bv8, se implantaron en ratones varias líneas de células tumorales, incluyendo A673, Calu-6, HM7, HPAC y Jurkat. Los análisis de Taqman™ indicaron que Bv8 se expresaba de forma alta en las células mieloides CD11b+Gr1+ (que consisten principalmente en neutrófilos, pero también incluyen células del linaje de macrófagos (Yang *et al.*, Cancer Cell 6: 409-421 (2004); Dahl *et al.*, Nat Immunol 4: 1029-1036 (2003); Lagasse y Weissman, J Immunol Methods 197: 139-150 (1996)) en comparación con las células CD11b-Gr1- (mayoritariamente del subconjunto no mielóide) (Figura 1b).

50

Para identificar las moléculas potencialmente implicadas en la regulación de la expresión de Bv8, se examinó por Taqman™ la capacidad de un grupo de citocinas/quimiocinas para inducir la expresión de Bv8 en las CMMO no clasificadas. La mayoría de las citocinas no causaron ninguna regulación positiva significativa de Bv8 en las CMMO (Figura 1c). Sin embargo, G-CSF (10 ng/ml) dio como resultado una regulación positiva de Bv8 espectacular (>27 veces, Figura 1c). Ninguna de las citocinas analizadas dio como resultado una regulación positiva clara de VEGF-A (datos no mostrados).

55

El análisis de distintos subconjuntos de CMMO reveló que en células GD11b+Gr1+ purificadas G-CSF dio como resultado la regulación positiva de Bv8 en más de 100 veces por encima del fondo (Figura 1d). En MO completa o en la fracción CD11b-Gr1- se detectó una regulación positiva de Bv8 mediada por G-CSF esencialmente menor. De modo sorprendente, GM-CSF no tuvo efecto sobre la expresión de Bv8 (Figura 1c y d), enfatizando así la naturaleza altamente selectiva de la regulación de este factor. Cabe destacar que IL-6 y SDF-1, que no muestran ninguna estimulación significativa cuando se prueban en células de MO no clasificadas, dieron como resultado una regulación positiva de Bv8 significativa de 2-3 veces cuando se probaron en células CD11b+Gr1+ purificadas

65

(Figura 1c y d).

Para caracterizar adicionalmente la respuesta a G-CSF en células CD11b+Gr1+, los inventores probaron si concentraciones más bajas, más relevantes fisiológicamente, de la citocina, podían inducir la expresión de *Bv8*. También, estudios previos han demostrado que la expresión del gen *Bv8* se puede aumentar por hipoxia (LeCouter *et al.*, 2003. citado anteriormente) y, así, los inventores deseaban probar si la hipoxia puede modular la respuesta de *Bv8* a G-CSF. Como se muestra en la Figura 1e, tan solo 20 pg/ml de G-CSF dieron como resultado la estimulación de ~10 veces de la expresión de *Bv8* en condiciones hipóxicas. Esta estimulación fue significativamente mayor que la detectada en condiciones normóxicas (~5 veces). Además de los estudios *in vitro*, se verificó *in vivo* la regulación positiva de *Bv8* por G-CSF. La administración de G-CSF recombinante a ratones Balb/c dio como resultado un aumento de los niveles de proteína *Bv8* en la MO (Figura 1f) y en el suero (Figura 2a) dependiente del tiempo y de la dosis, lo que era coincidente con un aumento de los neutrófilos de sangre periférica (SP) (Figura 2b). Se obtuvieron resultados similares en ratones Balb-c desnudos (datos no mostrados). Notablemente, tan pronto como 24 horas después de la administración de G-CSF, los niveles de *Bv8* en la MO aumentaron ~30 veces por encima del fondo. Los niveles en el suero también aumentaron espectacularmente. *Bv8* de MO y de suero regresó a cerca de los niveles iniciales dentro de las 48 horas después de interrumpir el tratamiento con G-CSF, lo que indica que G-CSF regula estrechamente a *Bv8* en la MO. Sin embargo, la administración de G-CSF no tuvo efecto sobre los niveles de *Bv8* en riñón, cerebro e hígado (datos no mostrados).

G-CSF es un regulador principal de la granulopoyesis, provocando que los progenitores mieloides/granulocíticos se diferencien en neutrófilos. G-CSF también desempeña un papel clave en la movilización de neutrófilos desde la MO en respuesta a diversos estreses ambientales, y lo secretan varios tipos celulares, incluyendo células endoteliales y fibroblastos (Christopher, M. J. y Link, D. C., *Curr Opin Hematol* 14, 3-8 (2007)). Además, G-CSF junto con otras citocinas hematopoyéticas, que incluyen IL-6 y SDF-1, se expresa de forma constitutiva en células tumorales y/o estromales en tumores malignos (revisado en Mueller, M. M. y Fusenig, N. E., *Differentiation* 70, 486-497 (2002)). Para probar si G-CSF, IL-6 o SDF-1 se expresan en los modelos tumorales de los inventores, los niveles de estas citoquinas se midieron en el medio condicionado por las células tumorales o en fibroblastos asociados al tumor. Como se muestra en la Tabla S 1, estas eran detectables, aunque a distintas concentraciones, en ambos compartimentos. Por lo tanto, la regulación positiva de *Bv8* mediada por G-CSF (y/u otra citocina) en la MO, puede contribuir a la movilización de células mieloides. La posterior conducción de estas células hacia el tumor puede regularse mediante citocinas adicionales y también de forma potencial mediante *Bv8* secretada por las células mieloides asociadas a tumor.

Para definir el papel potencial de G-CSF en la regulación de la expresión de *Bv8* dentro del microentorno tumoral, se incubaron CMMO cultivadas con alícuotas de lisados de tumores HM7 en presencia de anticuerpos anti G-CSF o de control (Figura 1g). El análisis de los transcritos de *Bv8* demostró en las CMMO tratadas con anti G-CSF una reducción dependiente de la dosis significativa de la expresión de *Bv8*, en comparación con los pocillos tratados con IgG de control. Cabe destacar que en presencia de anti G-CSF el nivel de expresión de *Bv8* bajó a niveles de sin estimulación, lo que sugiere la acción sin oposición de inhibidores de la expresión de *Bv8*, presentes en el homogenato tumoral. Los estudios *in vivo* confirmaron un papel clave de G-CSF en la regulación de la expresión de *Bv8*. La proteína *Bv8* estaba significativamente reducida en los ratones que no tenían tumor tratados con anti G-CSF, en comparación con los controles (Figura 1h).

A continuación, se probó si G-CSF desempeña un papel en la mediación de la regulación positiva de *Bv8* en la MO de ratones que tienen tumor. Como se ilustra en la Figura 1i, un anticuerpo monoclonal anti G-CSF, pero no así una IgG de control, prácticamente suprimió el pico de proteína *Bv8* que se producía en la MO poco después del implante del tumor. Se obtuvieron resultados muy similares con una IgG policlonal en cabra anti G-CSF (datos no mostrados). El tratamiento anti G-CSF también dio como resultado una reducción significativa de la frecuencia de células CD11b+Gr1+ circulantes, así como de médula ósea, en ratones que no tenían tumor y en los que sí lo tenían (Figuras C 2c-f). Por lo tanto, aunque los inventores no descartan la implicación de factores adicionales, sus hallazgos indican que la expresión de *Bv8* es dependiente de G-CSF, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Dada la fuerte regulación positiva de *Bv8* mediante G-CSF, los inventores pretendieron determinar si *Bv8* puede contribuir a la movilización de neutrófilos inducida mediante G-CSF recombinante (Figura 1j). Una dosis submáxima de G-CSF (2 µg) indujo una movilización significativa de CD11b+Gr1+ a la sangre periférica de los ratones dentro de las seis horas. Un anticuerpo anti G-CSF bloqueó de forma completa el efecto de G-CSF. Los anticuerpos anti *Bv8* (en lo sucesivo anti *Bv8*) también inhibieron la movilización mediada por G-CSF de las células CD11b+Gr1+ (Figura 1j). Sin embargo, los anti *Bv8* tuvieron poco efecto en la movilización inducida mediante una dosis máxima de G-CSF (10 µg). Por lo tanto, *Bv8* puede funcionar modulando o aumentando la movilización de neutrófilos estimuladas por G-CSF.

In vitro, *Bv8* promovió la migración de células CD11b+Gr1+ de médula ósea en un ensayo de transpocillo, en un grado comparable a SDF-1 (Figura C 3a). Los anti *Bv8* inhibieron de forma completa la migración estimulada por *Bv8* de células mieloides pero no tuvieron ningún efecto sobre la migración inducida por SDF-1, confirmando así la especificidad de los efectos. El análisis de TaqMan™ de los receptores de *Bv8*, R1 y R2 (Figuras C 3b y c) en la médula ósea reveló mayor expresión de R2 en comparación con R1. Sin embargo, la contribución precisa de R1

contra R2 en la mediación de la señalización de Bv8 en las CMMO todavía se tiene que determinar. Estos hallazgos sugieren que la regulación positiva específica de tipo celular de Bv8 y de sus receptores es parte del programa de activación génica de la médula ósea después del implante tumoral. Para caracterizar adicionalmente los efectos de Bv8 en las células del sistema hematopoyético, las células de linaje empobrecido (Lin⁻ que están desprovistas de células CD11b+Gr1+) y las células CD11b+Gr1+ se aislaron de la MO de ratones sin tratamiento previo y se trataron con Bv8 recombinante. El análisis de la población Lin⁻ indicó alta expresión de células CD11b+Gr1+ en las células tratadas con Bv8 en comparación con los controles, lo que sugiere que Bv8 altera el destino de la población progenitora hacia células del linaje mielóide (Figura C 3d). Además, el análisis de la viabilidad celular mostró que el número de células muertas en los pocillos tratados con Bv8 fue significativamente menor que en los controles, lo que indica que Bv8 es un factor de supervivencia potencial para células hematopoyéticas primitivas (Figura C 3d). Para evaluar de forma funcional los efectos de Bv8 sobre células Lin⁻, los inventores realizaron un análisis de UFC de las células tratadas con Bv8, las cuales mostraron un mayor número de colonias ($p < 0,05$) en comparación con las células tratadas de control (Figura C 3e). El análisis de las células CD11b+Gr1+ respaldó adicionalmente el papel de Bv8 como un factor de supervivencia, debido a que las células tratadas con Bv8 contenían menos células muertas en comparación con los controles (Figura C 3f). Para finalizar, el tratamiento de las células CD11b+Gr1+ con Bv8 dio como resultado la activación de la ruta de MAPK de una manera dependiente del tiempo (datos no mostrados).

Para elucidar el papel de Bv8 en la hematopoyesis normal, se probaron en ratones que no tenían tumor anticuerpos anti Bv8 o anti ambrosía (en lo sucesivo, de control). Ni el anti Bv8 ni el control mostraron ningún efecto significativo sobre la hematopoyesis normal y sobre los parámetros hematológicos en ratones Balb/c desnudos (Figura C 4). Estos datos sugieren que en el estado de equilibrio estacionario y condiciones fisiológicas Bv8 desempeña un papel muy limitado en la reputación de la hematopoyesis.

Para investigar la importancia de Bv8 en el crecimiento tumoral *in vivo*, los inventores probaron si la administración de los anticuerpos anti Bv8 o de control pueden afectar el crecimiento de varias líneas celulares de tumor trasplantadas en ratones inmunodeficientes. Como ilustra la Figura 2, en todos los modelos tumorales examinados la administración de anti Bv8 dio como resultado una disminución significativa del volumen tumoral y del peso tumoral terminal, en comparación con los animales tratados de control. En el modelo A673, la inhibición del crecimiento fue ~80 % y se acercaba a la conseguida con el Acm anti VEGF G6.31 (en lo sucesivo anti VEGF) o B20 (datos no mostrados), que bloquean VEGF-A de ratón y de ser humano (Liang *et al.*, J Biol Chem 281: 951-961 (2006)) (Figura 2a). El modelo de tumor HM7 también demostró una clara inhibición del crecimiento mediante el tratamiento anti Bv8 (Figura 2b). También se observó una significativa inhibición en tumores obtenidos de las líneas celulares de ser humano HPAC (Figura 2c) y Jurkat (Figura 2d). Los experimentos de implante de tumor mostrados se realizaron en ratones Balb/c desnudos. También se obtuvieron resultados similares en ratones Beige desnudos (datos no mostrados). Además de los xenoinjertos de ser humano, los anticuerpos anti Bv8 solos o en combinación con anti VEGF mostraron ser eficaces en la reducción de volumen tumoral en tumores TIB-42 insensibles a anti VEGF (Figura 2f). La interrupción del tratamiento dio como resultado un rápido crecimiento tumoral en ratones que tenían tumores A673 (Figura C 3g) y HM7 (Figura C 3h). Además, los análisis de los tumores revelaron un aumento del número de células CD11b+Gr1+ infiltrantes (Figura C 3i y j).

Para controlar a las células mieloides en distintas etapas de la tumorigénesis, los inventores investigaron las cinéticas de las células CD11b+Gr1+ en la MO, SP y en tumores en el modelo A673 en distintos puntos temporales (Figura C 5). El análisis de la MO no reveló ninguna diferencia significativa en la frecuencia de células CD11b+Gr1+ (Figura C 5a), entre los ratones tratados con anti Bv8 y los tratados de control. Sin embargo, en todos los puntos de tiempo probados hubo una reducción significativa de los números (datos no mostrados) y la frecuencia de células CD11b+Gr1+ en SP en los ratones tratados con anti Bv8 en comparación con los tratados de control (Figura C 5b). Además, los inventores encontraron una reducción significativa del número de células CD11b+Gr1+ en los tumores A673 en varios puntos de tiempo en los tumores tratados con anti Bv8 en comparación con los controles (Figura C 5c). Utilizando citometría de flujo (se muestran perfiles representativos de FACS en la Figura C 6), también se investigaron las cinéticas de las poblaciones de CD11b+Gr1+ en la SP, los tumores, la MO y el bazo de los ratones implantados con células Calu-6, HM7, HPAC y Jurkat (Figura 3a y b y también Figura C 7d y e). En consonancia con el estudio del curso temporal en tumores A673, el tratamiento con anti Bv8 dio como resultado una disminución significativa de la frecuencia de las células CD11b+Gr1+ en la SP, también en todos los modelos tumorales mencionados anteriormente (Figura 3a). También se observó una reducción significativa del número de CD11b+Gr1+ en los tumores en animales tratados con anti Bv8 (Figura 3b). Estos hallazgos indican que Bv8 regula la movilización y, potencialmente, el direccionamiento de las células CD11b+Gr1+ hacia los tumores. Además, los neutrófilos (principalmente identificados por la expresión de Gr1 (Okazaki, T. *et al.*, Int Immunol 18 1-9 (2006)) parecen ser la principal población afectada por el tratamiento anti Bv8.

Estudios previos han demostrado que el trasplante de células mieloides, incluyendo células CD11b+Gr1+, potencia el crecimiento tumoral, mientras que su empobrecimiento puede reducirlo. Para evaluar de forma directa el papel del subconjunto mielóide en el crecimiento tumoral que regula Bv8, los inventores aislaron células CD11b+Gr1+ de MO a partir de ratones que tenían tumores A673 o HM7, 7 días después del implante tumoral y las inyectaron en los tumores. Esto dio como resultado un crecimiento tumoral más rápido en los animales tratados con anti Bv8 (Figura 3c y d). Por lo tanto, un exceso de células CD11b+Gr1+ puede dominar la inhibición del crecimiento tumoral causado mediante el tratamiento anti Bv8. Para caracterizar adicionalmente al subconjunto mielóide en la médula ósea y en

los tumores, los inventores utilizaron F480 como un marcador de macrófagos infiltrantes en el subconjunto CDR11b. Los inventores encontraron que el tratamiento con anti Bv8 da como resultado una pequeña reducción del número de macrófagos (CD11b+F480+), en la médula ósea y dentro de los tumores en los ratones implantados con A673 (datos no mostrados). Por lo tanto, en tumores anti Bv8 parece afectar principalmente a los subconjuntos granulocítico y, en un grado menor, al de macrófagos.

Se observó un aumento significativo de la frecuencia de GD11b+Gr1+ en la MO y el bazo de ratones que tenían tumor, en comparación con los ratones implantados con Matrigel™ (Figuras S 7a y b). Sin embargo, a diferencia de la reducción observada en la SP y en tumor, el tratamiento anti Bv8 no afectó claramente la frecuencia de células CD11b+Gr1+ en la MO y el bazo. El análisis de UFC de la MO y de esplenocitos aislados de ratones que tenían tumores A673 y HM7 (Figura 7Sc) mostró que el número de colonias en los ratones tratados con anti Bv8 se redujo de forma significativa en comparación con los ratones tratados de control. Estos hallazgos sugieren que la neutralización de Bv8 *in vivo* afecta a la capacidad de los esplenocitos y de las células de MO para diferenciarse y formar colonias *in vitro*.

La magnitud de los efectos antitumorales de los anticuerpos anti Bv8 es improbable que se expliquen únicamente por la disminución de los números de células CD11b+Gr1+ en los tumores, lo que se esperaría que de cómo resultado niveles reducidos de MMP-9 y VEGF-A (Yan *et al.*, *Cancel Cell* 6: 409-421 (2004); Nozawa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 12493-12498 (2006)). Es probable que la neutralización local de las actividades de Bv8 sea un mecanismo principal de los efectos antitumorales de anti Bv8. Se ha caracterizado a Bv8 y a la EG-VEGF relacionada como mitógenos selectivos de tipos celulares endoteliales específicos, Burgers, G. *et al.*, *Nat Cell Biol* 2, 737-744 (2000); Lin, R. *et al.*, *J Biol Chem* 277, 8724-8729 (2002)). Por lo tanto los inventores pretendieron determinar si Bv8 afecta a la vasculatura tumoral. Los inventores establecieron y caracterizaron cultivos de células endoteliales asociadas a tumor (CEAT) de tumores xenoinjertados. Las CEAT formaron conductos en Matrigel™ en respuesta a VEGF-A, mientras que los pocillos de control mostraron poca o ninguna prueba de la formación de conductos (Figura C 8a). La adición de proteína Bv8 promovió la formación de conductos en un grado comparable a la que inducía VEGF-A (Figura C 8a). Los anticuerpos anti Bv8 bloquearon la formación de conductos inducida por Bv8 pero no inhibieron la formación de conductos inducida por VEGF. Estos hallazgos confirman la especificidad de los efectos y también sugieren que Bv8 y VEGF emplean distintas rutas para inducir la formación de conductos en las CEAT. Los análisis de PCR confirmaron la expresión de marcadores de células endoteliales, pero no de células epiteliales, tales como CD31, VEGF2 y Tie2 en las CEAT, lo que verificó la naturaleza endotelial de las CEAT (Figura C 8b). De acuerdo con estos hallazgos, Bv8 o VEGF-A dieron como resultado una fuerte inducción de la fosforilación de la MAP cinasa en las CEAT (Figura C 8c). El análisis de Taqman™ mostró expresión de EG-VEGF/PKR-1 y -2 en las CEAT (datos no mostrados). Sin embargo, Bv8 recombinante no logró estimular la proliferación de varias líneas de células tumorales *in vitro* (Figura C 8d), apoyando adicionalmente la hipótesis de que Bv8 tiene como diana en el entorno tumoral principalmente a células endoteliales.

Para corroborar la hipótesis de que Bv8 puede promover de forma local la angiogénesis tumoral, un adenovirus recombinante que codifica Bv8r (Av-Bv8) se suministró por vía intratumoral en ratones que tenían tumor HM7. Los Av-LacZ y Av-VEGF sirvieron como controles negativo y positivo, respectivamente. Para minimizar cualquier efecto sistémico de las proteínas recombinantes, los inventores administraron bajos títulos de virus (10^7 ufp). En comparación con el control Av-LacZ, Av-Bv8 dio como resultado un aumento de los volúmenes tumorales, en comparación con el control mediante Av-VEGF (Figura 4a). En concordancia con las observaciones *in vitro*, la administración de Av-Bv8 dio como resultado la movilización potenciada de CD11b+Gr1+ en comparación con Av-LacZ y Av-VEGF (Figura 4b). Altos títulos (10^9 ufp) de Av-Bv8 también potenciaron el crecimiento tumoral y dieron como resultado una movilización mayor de células CD11b+Gr1+ en la SP y en el tumor (datos no mostrados).

Para evaluar la vasculatura tumoral, se empleó tomografía microcomputerizada (Tmicro-C) de rayos X (Garcia-Sanz, A., *et al.*, *Hypertension* 31, 440-444 (1998); Maehara, N., *Eur radiol* 13, 1559-1565 (2003); Kwon, H. M. *et al.*, *J Clin Invest* 101, 1551-1556 (1998)). La Tmicro-C proporciona un análisis global de la vasculatura tumoral en el tumor completo y así puede superar algunas limitaciones inherentes a otras estrategias tales como la inmunohistoquímica (IHQ). Tal análisis demostró que Av-Bv8 y Av-VEGF tenían efectos casi indistinguibles, dado que ambos dieron como resultado aumentos ($p < 0,05$) del volumen vascular (Figura 4c) en comparación con el grupo Av-LacZ. Las imágenes representativas de la masa tumoral completa de cada grupo de tratamiento se muestran en la Figura 45e. Las interpretaciones de la superficie de la red vascular (rojo) y del tumor (gris) extraídos se generaron mediante el algoritmo de procesamiento de imágenes que define las regiones volumétricas empleadas en el análisis. La IHQ para MECA-32 confirmó un aumento significativo de las áreas de superficie vascular en los tumores HM7 después de la administración de Av-Bv8, con respecto a Av-LacZ de control (Figura C 9a).

Para investigar adicionalmente el papel de Bv8 en la angiogénesis tumoral, utilizando una estrategia de pérdida de función los inventores analizaron la vasculatura tumoral en tumores HM7 tratados con anticuerpos anti Bv8, anti VEGF o de control. De acuerdo con los experimentos ilustrados en la Figura 2, el tratamiento anti Bv8 dio como resultado una reducción significativa del volumen tumoral (Figura 4f) y de las células CD11b+Gr1+ circulantes (Figura 4g) en comparación con los ratones tratados de control. Utilizando la misma estrategia angiográfica de Tmicro-C descrita anteriormente, el análisis de la vasculatura tumoral reveló reducciones significativas del volumen vascular en los grupos anti Bv8 y anti VEGF con respecto a los tumores tratados de control (Figura 4h). También se

redujo significativamente la densidad de los vasos sanguíneos (VVVT) en los grupos anti Bv8 y anti VEGF con respecto al control (Figura 4i). Los datos de Tmicro-C apoyan la hipótesis de que la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con anti Bv8 es un resultado de la inhibición del desarrollo de la vasculatura tumoral. En la Figura 4j se muestra una imagen representativa de la masa tumoral completa. Por lo tanto, utilizando estrategias de ganancia y pérdida de función, los datos de los inventores indican que Bv8 promueve el crecimiento tumoral, principalmente a través de la inducción de la angiogénesis tumoral. Los exámenes histológicos también fueron consistentes con un papel de Bv8 en la promoción de la angiogénesis tumoral (Figura C 9b). El análisis de las células endoteliales en los tumores Jurkat indicó que, de forma similar a anti VEGF, la administración de anticuerpos anti Bv8 inhibió claramente la vascularización tumoral.

Para caracterizar la expresión de Bv8 en diversos tejidos de una manera dependiente del tiempo (Figura 5), los inventores midieron los niveles de proteína Bv8 en MO (Figura 5a), SP (Figura 5b), bazo (Figura 5c) y tumores (Figura 5d), en ratones que tenían tumores HM7 y tratados con control o con anti VEGF. El análisis de los niveles de proteína Bv8 en los ratones tratados de control revelaron un pico en MO, SP y bazo, poco después del implante del tumor. Sin embargo, los ratones tratados con anti VEGF mostraron mínima expresión de Bv8 en tales etapas iniciales, debido posiblemente a la eficaz supresión tumoral que causó el tratamiento. Por lo tanto, en los últimos puntos de tiempo, de forma coincidente con el inicio del crecimiento tumoral independiente de VEGF, los niveles de Bv8 aumentaron de forma significativa en los ratones tratados con anti VEGF, en especial en SP, bazo y tumores (Figura 5b-d). De acuerdo con estos hallazgos, se observó una gran infiltración de células Gr1+ en áreas necróticas de los tumores A673 y HM7 tratados con anti VEGF durante 15 o 21 días (Figura 5e). Una posible explicación es que la hipoxia prolongada y/o la necrosis tumoral causada por anti VEGF desencadenan la activación de la MO y la incorporación de neutrófilos. Estos hallazgos coinciden con experimentos anteriores que muestran que en varios modelos tumorales murinos, el tratamiento anti VEGF da como resultado la regulación positiva del ARNm de Bv8, lo que sugiere que Bv8 podría contribuir a la resistencia a la terapia anti VEGF (datos no mostrados). Para definir adicionalmente las fuentes de Bv8 en los tumores, los inventores subfraccionaron las poblaciones celulares en fracciones CD11b+ y CD11b-, en los tumores A673, Calu-6, HM7, HPAC y Jurkat. El análisis de Taqman™ mostró una regulación positiva significativa del transcrito de Bv8r en el compartimento CD11b+, en comparación con la fracción negativa (Figura 5f). Sin embargo, utilizando cebadores de Bv8 de ser humano, la PCR no identificó Bv8 de ser humano en ninguna población (Figura 5f), es decir, CD11b+ y CD11b- asociadas con tumor, lo que sugiere que el estroma tumoral, en particular las células mieloides, es la fuente principal de Bv8 en todos los tumores probados. De acuerdo con estos hallazgos, ninguna de las líneas de células tumorales probadas produjo niveles detectables de proteína Bv8 *in vitro* por ELISA (datos no mostrados).

Por lo tanto, el tratamiento anti Bv8 podría ser más eficaz cuando se combina con anti VEGF. Para probar esta hipótesis, los inventores implantaron células HM7 (Figura 6a) o A673 (Figura 6b) en ratones e iniciaron los tratamientos después de que los tumores habían alcanzado volúmenes de ~400 mm³. De forma concordante con la presencia de menores niveles intratumorales de Bv8, el tratamiento anti Bv8 tuvo un efecto menor sobre la inhibición del crecimiento tumoral en los tumores de HM7 y A673 en comparación con el tratamiento en etapas tempranas (Figura 2). Anti VEGF proporcionó una inhibición más completa, pero los tumores con el tiempo eludieron este efecto. Sin embargo, la combinación de los tratamientos anti VEGF y anti Bv8 inhibió de forma significativa ($p < 0,05$) el crecimiento tumoral en comparación con cada monoterapia. Así mismo, la terapia de combinación dio como resultado una reducción significativa del volumen y peso tumorales en los linfomas murinos TIB42 (Figura 2e) y EL4 (Figura 6c), los que son insensibles al tratamiento anti VEGF. Por lo tanto, los datos de los inventores sugieren que el tratamiento anti Bv8 tiene un potencial para la terapia de combinación en tumores que son insensibles al tratamiento anti VEGF.

Para verificar que los efectos de anti Bv8 no se limitan a ratones inmunodeficientes, los inventores implantaron la línea celular EL4 murina resistente a anti VEGF en ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes y probaron los efectos de la monoterapia de anti Bv8 o anti VEGF, así como la combinación. Como se ilustra en las Figura 6, c y d, los efectos de tales tratamientos fueron casi indistinguibles en las dos cepas. Estos hallazgos indican que anti Bv8 puede suprimir el crecimiento tumoral incluso en presencia de un sistema inmunitario intacto. Como apoyo adicional a esta conclusión, el tratamiento anti Bv8 inhibe el cambio angiogénico en el modelo de carcinogénesis de etapas múltiples Rip-Tag en ratones inmunocompetentes (observaciones no publicadas).

Los agentes citotóxicos son conocidos por dar como resultado la movilización de células hematopoyéticas de la MO (Neben, S. *et al.*, Blood 81, 1960-1967 (1993)). Además, la necrosis tumoral que induce la quimioterapia puede dar como resultado una liberación de citocinas tales como G-CSF, seguido de un aumento compensatorio de la producción de neutrófilos (Kavgaci, H. *et al.*, J Exp Clin Cancer Res 21, 475-479 (2002)). Por lo tanto, los inventores se propusieron investigar si el tratamiento con agentes citotóxicos, solos o en combinación con anti VEGF, puede afectar la eficacia del tratamiento anti Bv8. Para este fin, se implantaron células A673 en ratones y se trataron con cisplatino, solo o en combinación con anti Bv8, anti VEGF o en combinación de los dos tratamientos. El nivel de Bv8 en el suero aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) en los ratones tratados con cisplatino, solo o en combinación con anti VEGF (Figura 6e). Anti Bv8 y anti VEGF potenciaron la actividad antitumoral del cisplatino. Sin embargo, la combinación de cisplatino más anti VEGF y anti Bv8 dio como resultado la inhibición casi completa del crecimiento tumoral en A673 ($p < 0,05$; Figura 6f). Por lo tanto, el tratamiento anti Bv8 podría utilizarse como un agente aditivo en combinación con anti VEGF o con agentes citotóxicos. La Figura C 8 ilustra un modelo para el papel de Bv8 en la

tumorigénesis.

Las crecientes pruebas sugieren que afectar la incorporación al tumor o las propiedades angiogénicas de las células mieloides puede representar una estrategia antineoplásica nueva (Shojaei, F., *et al.*, Nature Biotechnol 25: 911-20 (2007)). Sin embargo, el avance en lograr este objetivo se ha entorpecido por la complejidad y la potencial redundancia de los mediadores. Los hallazgos de los inventores indican que, a pesar de tal complejidad, el bloqueo de la acción de una única citocina, Bv8, tiene un impacto significativo en el crecimiento de múltiples tipos tumorales. Por lo tanto, estos datos plantean la posibilidad de que Bv8 o sus receptores representen dianas terapéuticas para futuras terapias antiangiogénicas. Se necesitan estudios adicionales para definir adicionalmente el papel de este sistema de señalización en distintos tipos tumorales y en distintas etapas de la evolución tumoral. Cabe destacar que estudios recientes han mostrado que la administración de G-CSF puede acelerar el crecimiento tumoral (Okazaki, T., *et al.*, citado anteriormente; Hirbe, A. C., *et al.*, Blood 109, 3424-3431 (2007)). Que la regulación positiva de Bv8 contribuya a tales efectos es una posibilidad interesante que merece investigación adicional. A la inversa, los anticuerpos anti G-CSF pueden inhibir el crecimiento tumoral mediante la reducción de la expresión de Bv8. El laboratorio de los inventores está investigando esta posibilidad.

Para finalizar, el hallazgo de que la expresión de Bv8 es tan exquisitamente sensible a G-CSF vincula a Bv8 con un mecanismo homeostático principal implicado en la regulación de la diferenciación y producción de neutrófilos. Por lo tanto, es posible que Bv8 desempeñe un papel patofisiológico más amplio, que incluye a tipos no tumorales de angiogénesis mediada por células inflamatorias.

Ejemplo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de células de médula ósea de ser humano completa a partir de recolecciones de médula ósea recién obtenidas

Las muestras de médula ósea recién obtenidas se obtuvieron de ALLCELLS (Emeryville, CA). Primero se diluyó la médula ósea con DMEM que contenía SFB al 10 % y después se pasaron a través de un tamiz de células de 40 µm (BD Biosciences, Bedford, MA) para eliminar residuos tisulares. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se lisaron los glóbulos rojos durante 30 segundos en presencia de NaCl al 0,2 % enfriado en hielo, seguido de la adición de NaCl al 1,6 % enfriado en hielo.

Aislamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos a partir de sangre periférica

Los procedimientos de aislamiento fueron como se describe previamente (Kulczycki A, Jr. J Immunol 133: 849-854 (1984)), con modificaciones menores. Brevemente, sangre recién obtenida de ser humano sano heparinizada (Health Services, Genentech Inc.) se aplicó sobre Medio de Separación de Linfocitos CAPPEL LSM (MP Biomedicals, Solon, Ohio). Después de la centrifugación a 3000 rpm durante 15 min sin freno, se retiró el plasma y se recogieron los monocitos de la interfase. Los monocitos se purificaron adicionalmente utilizando el kit Monocyte isolation kit II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y clasificando por FACS. La pureza de la población celular se evaluó mediante FACS por la expresión de CD14⁺ CD16⁻. Los linfocitos se recolectaron mediante la recogida de las células que se unían a la columna y se examinó su pureza por la expresión de CD3 para los linfocitos T, y la expresión de CD19 para los linfocitos B. Se recogieron los neutrófilos retirando de forma cuidadosa la capa inmediatamente por encima de los glóbulos rojos, seguido de la adición de HBSS (sin Ca²⁺ y Mg²⁺) y Dextrano 500 al 6 % (GE Healthcare Biosciences AB, Suecia) preparado en NaCl al 0,9 %. Después de dejar que los glóbulos rojos se posen durante 30-60 min a TA, se retiraron los neutrófilos del sobrenadante. Los glóbulos rojos residuales se retiraron adicionalmente hasta que se eliminó >90 % de ellos. La pureza de las células se evaluó mediante análisis de FACS como poblaciones CD15⁺ CD16⁺. Las tres poblaciones de sangre periférica (neutrófilos, monocitos y linfocitos) estaban >95 % puras mediante análisis de FACS y de morfología. Después las células se lavaron una vez con HBSS que contenía BSA al 0,2 % (bajo en endotoxina, Serologicals, Corp. Norcross, GA) antes de su uso.

Análisis de la expresión génica mediante Taqman

Se preparó ARN utilizando el kit RNeasy™ Mini Kit (Qiagen). Para el análisis de PCR en tiempo real (Taqman) se utilizaron 50 ng de ARN total por reacción. Para Bv8 de ser humano, sirvió como control ARN de testículo (BD Biosciences). Las reacciones se ejecutaron en el modo 9600 Emulation del sistema 7500 Real time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la cuantificación absoluta con la curva estándar se utilizó con el programa informático Sequence Detection System (SDS). El nivel de expresión de cada gen se cuantificó adicionalmente en la misma muestra con respecto al gen constitutivo RPL19. Las secuencias de los cebadores de Taqman son como sigue: Bv8 de ser humano directo: ATG ACG CGG AAG CTA GGA (SEC ID N°: 10), inverso: GCA GAG CTG AAG TCC TCT TGA (SEQ ID NO: 11), sonda: TGC TGC TGG ACC CTT CCT AAA CCT (SEQ ID NO: 12); RPL19 de ser humano directo: CGC AAG CGC CGT GAA (SEQ ID NO: 28), inverso: GGT CTC TCC CTG CTT GGA TAA AGT C (SEQ ID NO: 29), sonda: CCA GGC CAA GAA GGA GGA GAT CAT CA (SEC ID NO: 30). VEGF específico de ser humano directo: AAT GAC GAG GGC CTG GAG T (SEC ID N°: 31), inverso: TTT ATC CGC ATA ATC TGC ATG (SEQ ID

NO: 32), sonda: TGT GCC CAC TGA GGA GTC CAA CAT CA (SEC ID NO: 33).

Los reactivos de Taqman para PKR1/LG-VEGFR1 y PKR2/EG-VEGFR2 de ser humano se obtuvieron de Applied Biosystems.

5

Regulación de la expresión del gen Bv8 en células sanguíneas cultivadas

Las MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, bFGF, VEGF, GM-CSF, G-CSF, SDF-1 α , M-CSF, Eritropoyetina (EPO) y TNF α de ser humano recombinantes se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN). Las IL-8, IFN γ , Bv8 (Procineticina-2), IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β de ser humano recombinantes eran de PeproTech Inc. (Rocky Hill, New Jersey). El SCF (factor de células madres) era de Invitrogen Biosource (Carlsbad, CA). En algunos casos, se utilizó G-CSF de Amgen (Neupogen/Filgrastim). Todas las citoquinas se utilizaron a 10 ng/ml. Las células recién obtenidas purificadas se lavaron y se resuspendieron en medio HBSS que contenía BSA al 0,2 % (endotoxinas bajas, Serologicals Corp. Norcross, GA). Se incubaron dos millones de células en placas de 24 pocillos con diversas citocinas y quimiocinas durante 4 horas a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 %. Después, las células se transfirieron a tubos eppendorf, se centrifugaron y lisaron con tampón de lisis de ARN (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluó la expresión de *Bv8* mediante Taqman con RPL19 (Proteína Ribosomal L19) como el gen de control interno.

15

20

Purificación parcial de la proteína Bv8 a partir de neutrófilos de sangre periférica

Se aislaron neutrófilos de 500 ml de sangre de ser humano recién obtenida, como se describe anteriormente. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de Tritón X-100 al 0,5 % con inhibidores de proteinasas (Roche) y se lisaron a 4 °C durante 10 min en un agitador. Después, los lisados celulares se forzaron a pasar dos veces a través de una aguja de calibre 25, y las concentraciones de sales se ajustaron a NaCl 50 mM, Tris HCl 20 mM (pH 7,3). El extracto crudo se aplicó a una columna de heparina-Sefarosa (Amersham Biosciences, Suecia) preequilibrada con Tris 20 mM pH 7,2, NaCl 50 mM y Tritón X-100 al 0,5 %. La columna se eluyó utilizando un gradiente lineal: NaCl 50 mM a 2 M en Tris 20 mM, pH 7,3, en presencia de Tritón X-100 al 0,5 %. El caudal fue de 1 ml/min. Se controló la absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 1 ml y se ensayaron para Bv8 de ser humano mediante ELISA. Después las fracciones del pico de Bv8 y varias fracciones que no pertenecían al pico se agruparon y concentraron hasta 10 veces utilizando Microcon Centrifugal Filter Devices, Ultracel YM-3 (Millipore, Bedford, MA) y se probó su actividad biológica.

25

30

ELISA de Bv8 humano

Se recubrieron placas de micropocillos de 96 pocillos MaxiSorp® (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con 1,0 μ g/ml de anticuerpo monoclonal de ratón 3F1 (Genentech Inc.) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron con PBS que contenía polisorbato 20 al 0,05 % y se bloquearon con seroalbúmina bovina al 0,5 %, Proclin 300 15 p.p.m. (partes por millón) (Supelco, Bellefonte, PA) en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Después de que se lavaran las placas, los estándares de Bv8 de ser humano (0,020-2,5 ng/ml en diluciones en serie con factor 2, PeproTech, Rocky Hill, NJ) y las muestras (dilución mínima 1:10) en PBS que contenía seroalbúmina bovina al 0,5 %, polisorbato 20 al 0,05 %, Proclin 300 15 p.p.m. (Supelco, Bellefonte, PA) y NaCl 0,35 N (tampón de muestra) se diluyeron en serie y se añadieron a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de una etapa de lavado. La Bv8 unida se detectó añadiendo el anticuerpo secundario, un anticuerpo anti BV8 en hámster biotinilado clon 3B8 (Genentech Inc.) seguido de la adición de estreptavidina-HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como sustrato. La reacción se finalizó añadiendo ácido fosfórico 1 M. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de microplacas ThermoMax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Las curvas de titulación de los estándares se calcularon utilizando un programa de ajuste de curva de regresión de cuatro parámetros (Genentech Inc). La concentración de Bv8 de ser humano se calculó extrapolando los valores de densidad óptica de las muestras al intervalo de datos de la curva estándar. El ELISA de Bv8 fue capaz de medir tampón de lisis hasta al 10 % y tuvo la sensibilidad para detectar Bv8 en los lisados tisulares hasta tan bajo como 0,20 ng/ml. El ELISA se desarrolló y optimizó de forma específica para Bv8 debido a que EG-VEGF, VEGF-A, VEGF-C y G-CSF de ser humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) hasta 30 μ g/ml solamente proporcionan señal de fondo; la presencia de estas moléculas y de anti VEGF (Genentech Inc.) hasta 30 μ g/ml no afectó la detección de Bv8 de ser humano 100 pg/ml en tampón de muestra. Este ELISA también pudo detectar Bv8 de ratón pero con sensibilidad menor al 7 %.

35

40

45

50

55

Ensayo de bioactividad de Bv8

Las células GeneBLazer® NFAT-CHO se obtuvieron de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Las células se transfectaron de forma estable con PKR1/EG-VEGFR1 y se cultivaron en DMEM (alta glucosa) que contenía suero dializado al 10 %, AANE 0,1 mM, GlutaMax™ (Gibco) 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, zeocina 10 μ g/ml, higromicina 500 μ g/ml. Las células se sembraron en placa en "Viewplacas" de 96 pocillos (Packard) con 2,5x10⁴ en 80 ml/pocillo en DMEM al 1 % durante una noche en CO₂ al 5 %, 37 °C. En el día siguiente, las células se trataron con diversas fracciones de columna y se concentraron con Microcon Centrifugal Filter Devices (Ultracel YM-3) de Millipore. Como control positivo se utilizó Bv8h 0,2-0,02 ng/ml (Peprotech Inc.) preparada en DMEM al 1 %. Una hora más tarde, se

65

retiró el medio y se reemplazó con 80 ml de solución de Hank que contenía BSA al 0,1 % y tampón de carga 6X que contenía CCF4 1 mM (Invitrogen Corporation). Las placas se incubaron durante 1,5 h a temperatura ambiente en oscuridad y se leyeron en un lector de placas Wallac con longitud de onda de excitación de 410 nm y longitud de onda de emisión de 450/520 nm. Los controles negativos eran células sin ligando añadido y medio de control solo.

5 Las células CHO se estimularon con Bv8 de ser humano recombinante o con las fracciones agrupadas durante 1 h antes de añadir el sustrato de β -lactamasa CCF4. Para evaluar la especificidad de las fracciones de la columna, se añadieron los anticuerpos anti Bv8 2139 y 3F1 a 20 mg/ml.

Análisis de leucocitos de donantes tratados con G-CSF

10 Se obtuvieron leucocitos periféricos de donantes normales después de 4-5 días de tratamiento con G-CSF mediante recolecciones por aféresis (Cellular Therapy and Cell Processing Facilities, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA). Por el mismo procedimiento se recogieron leucocitos de individuos no tratados y sirvieron como controles no relacionados. Después las células se concentraron y se resuspendieron en medio crioprotector con seroalbúmina de ser humano más DMSO al 10 %. Después de descongelar en un baño de agua a 37 °C, la viabilidad celular era >95 % mediante la prueba de exclusión de azul de tripán. Para la extracción de ARN o las mediciones de proteína, las células se lavaron brevemente con tampón HBSS que contenía BSA al 0,2 % y se lisaron en tampón de lisis de ARN (Qiagen) o en tampón RIPA que contenían inhibidores de proteinasas (Roche).

Quimiotaxis de neutrófilos de sangre periférica

20 Se lavaron 10^6 células con HBSS que contenía BSA al 0,2 % antes de ponerlas en insertos de transpocillos con un tamaño de poro de 5 μ m (Corning Incorporated, Lowell, MA). En la cámara inferior, se añadió medio solo o medios con diversas citocinas a diversas concentraciones (máxima a 200 ng/ml). Después de 3 h a 37 °C, las células en la cámara inferior se transfirieron, se mezclaron con 9 ml de solución ZPAK y se contaron en un Contador de Partículas y Analizador de Tamaño Z2 Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Cultivo de células de leucemia de ser humano

30 Las células U937, HL-60, THP-1, HeL 92.1.7, KG-1, K562 y Jurkat se obtuvieron de la ATCC® (Manassas, VA). La mayoría de las células se cultivaron en RPMI que contenía SFB al 10 %. Las células KG-1 se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía SFB al 20 %. Para las células THP-1, se utilizó RPMI que contenía SFB al 10 % con Piruvato de Sodio, HEPES y β -mercaptoetanol. Para los estudios de regulación, se utilizaron 1 millón de células con viabilidad superior al 95 %. Los estudios de regulación se realizaron en condiciones de normoxia e hipoxia durante 4 horas en 1 ml de medio HBSS que contenía BSA al 0,2 %.

Análisis estadísticos

40 Para calcular la significación estadística se utilizó la prueba t de Student.

RESULTADOS

Regulación de Bv8 en médula ósea de ser humano y en diversas células sanguíneas

45 Se había informado anteriormente que G-CSF da como resultado una regulación positiva espectacular (>30 veces) de la expresión de Bv8 en células de médula ósea y en neutrófilos periféricos de ratón (Shoji et al., Nature 450: 825-831 (2007) y Ejemplo 1).

50 En el presente estudio, se evaluó si G-CSF es también un inductor de la expresión de Bv8 en neutrófilos periféricos aislados y en células de médula ósea completa de ser humano. G-CSF 10 ng/ml dio como resultado un promedio de 7 veces (intervalo 6-12) de inducción de la expresión de Bv8 dentro de las 4 h. El menor aumento en veces en comparación con los neutrófilos de ratón puede deberse, por lo menos en parte, a una expresión basal de Bv8 mayor en células de ser humano (datos no mostrados). Los estudios de curso temporal indicaron que G-CSF induce al ARNm de Bv8 dentro de las 4 h, y el efecto se mantuvo durante hasta 24 h (datos no mostrados). Los inventores identificaron a GM-CSF como un regulador positivo adicional de la expresión de Bv8 en células de médula ósea y neutrófilos de ser humano (Figura 14A y B). Con GM-CSF 10 ng/ml se observó un aumento significativo de ~2,5 veces de la expresión de Bv8. Esto difiere de los neutrófilos de ratón que no mostraron inducción de Bv8 mediante GM-CSF. Otras citocinas probadas, que incluían IL-6, IL-1 β , y EPO (Eritropoyetina), no tuvieron efecto estimulante sobre la expresión de Bv8 de ser humano en neutrófilos o células de la médula ósea.

65 A diferencia de los neutrófilos, los monocitos y linfocitos no mostraron ningún cambio en la expresión de Bv8 en respuesta a G-CSF (Figura 14C y D). De forma sorprendente, GM-CSF disminuyó la expresión de Bv8 en monocitos de ser humano, con aproximadamente el 75 % de inhibición después de 4 h de tratamiento. IL-10 reguló de forma positiva la expresión de Bv8 en monocitos y linfocitos, mientras que SDF-1 α mostró un efecto estimulante significativo sólo sobre monocitos (Figura 14C y D). En monocitos y linfocitos se encontró un nivel basal de

expresión de Bv8 más bajo en comparación con el de neutrófilos o células de médula ósea (datos no mostrados).

En conclusión, los efectos de G-CSF y GM-CSF sobre la expresión del gen de Bv8 en neutrófilos fueron bastante exclusivos, dado que dos citocinas relacionadas, M-CSF y SCF, no tuvieron efecto.

5

Regulación de los receptores de Bv8 en células de médula ósea y en neutrófilos de ser humano

A diferencia de los neutrófilos de ratón, que expresan PKR1/EG-1-VEGFR1 y PKR2/EG-VEGFR2, los neutrófilos de ser humano aislados expresan a nivel detectable solamente PKR2/EG-VEGFR2. Después de 4 h de incubación *in vitro*, GM-CSF, pero no G-CSF, causaron una regulación positiva significativa de la expresión de PKR2/EG-VEGFR2 (con una inducción promedio de 4 veces) (Figura 15 A). En médula ósea de ser humano, G-CSF y GM-CSF parecen regular a PKR2/EG-VEGFR2 hasta un nivel significativo (Figura 15 B).

10

Regulación positiva de Bv8 y PKR2/EG-VEGFR2 en células mononucleares periféricas movilizadas de donantes tratados con G-CSF

15

A través de recolecciones por aféresis se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de 11 individuos no tratados y de 12 individuos tratados con G-CSF. Los inventores examinaron la expresión del gen de Bv8 mediante Taqman y también midieron los niveles de proteína Bv8 mediante ELISA. Se detectó un aumento de aproximadamente 4,5 veces de la expresión de Bv8 y un aumento de 10 veces del nivel de proteína, en células mononucleares movilizadas por G-CSF en comparación con células mononucleares de donantes no tratados (Figura 16). De forma similar, PKR2/EG-VEGFR2, pero no PKR1/EG-VEGFR1, fue detectable en leucocitos recogidos en clínica cuando los pacientes se trataron con G-CSF durante 4-5 días. Las células mononucleares de individuos tratados con G-CSF mostraron una inducción significativa de la expresión de PKR2/EG-VEGFR2 (~2 veces) en comparación con las muestras de control no tratadas (Figura 16B).

20

25

La Bv8 producida por neutrófilos de ser humano es biológicamente activa

Para caracterizar la proteína Bv8, los inventores solubilizaron sedimentos de neutrófilos de ser humano periféricos en Tritón X-100 al 0,5 %. Después, los lisados de neutrófilos se sometieron a cromatografía de afinidad de heparina-Sefarosa como se describe en los Materiales y Métodos. Como se ilustra en la Figura 14A, Bv8 se unió a la columna y se eluyó en presencia de NaCl ~0,4 M, de forma similar a la proteína Bv8 de ratón. El ELISA confirmó adicionalmente la presencia de Bv8 en las fracciones 9, 10 y 11 (Figura 17 A).

30

Debido a que se encontró que en los ensayos de proliferación incluso cantidades traza de Tritón® X-100 son significativamente citotóxicas para las células endoteliales, los inventores pretendieron probar la actividad de la proteína Bv8 obtenida de neutrófilos en un ensayo que necesita tiempos de estimulación más cortos. Los inventores tomaron ventaja de las células CHO transfectadas de forma estable con PKR1/EG-VEGF1, como se describe en los Materiales y Métodos. Como se esperaba, Bv8 de ser humano recombinante (0,2-200 ng/ml) causó una estimulación dependiente de la dosis (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 17B, las fracciones de la columna que contenían Bv8 inmunorreactiva mostraron una estimulación significativa en comparación con el control de tampón de Tritón® X-100. Sin embargo, las fracciones laterales, desprovistas de Bv8 inmunorreactiva, no mostraron efecto estimulante. También, los anticuerpos anti Bv8 bloquearon la estimulación de las fracciones agrupadas que contenían Bv8. VEGF-A probada hasta 200 ng/ml no causó ninguna respuesta, confirmando adicionalmente la especificidad de los efectos.

35

40

45

Efecto de Bv8 sobre la migración de neutrófilos

Los inventores probaron la posibilidad de que Bv8 pueda tener efectos quimiotácticos sobre neutrófilos de ser humano. Como se ilustra en la Figura 18, Bv8 indujo una estimulación significativa de la quimiotaxis, con un efecto máximo de ~3 veces por encima del control. Cabe destacar que la estimulación máxima se produjo a una concentración muy baja de Bv8 (~2 pM). Se observó un patrón similar en 6 donantes independientes (Figura 18). Otros factores quimiotácticos tales como SDF-1 α , IL-8 y G-CSF, necesitaron concentraciones mayores (20 nM) para estimular la migración de neutrófilos. VEGF y MCP-1 no mostraron efectos en ninguna de las concentraciones probadas (datos no mostrados).

50

55

Expresión de Bv8 en diversas líneas celulares de leucemia de ser humano y regulación por G-CSF

Para determinar si las células leucémicas expresaban Bv8, los inventores probaron un grupo de líneas celulares de ser humano. La expresión de Bv8 era indetectable en las líneas celulares Jurkat y K562 (datos no mostrados). Sin embargo, se encontraron niveles detectables de ARNm de Bv8 en las líneas celulares HL-60, KG-1, HeL 92.1.7 y U937. G-CSF 10 ng/ml indujo un aumento de la expresión de Bv8 (2-3 veces) en varias líneas celulares (Tabla Complementaria 2). Sin embargo, no se observó inducción significativa mediante GM-CSF en ninguna de las líneas celulares probadas. Ni G-CSF ni GM-CSF afectaron la expresión de Bv8 en la línea celular de leucemia promielocítica aguda HL-60.

60

65

Discusiones

Los neutrófilos y otras células mieloides son mejor conocidas por su papel en la inmunidad innata, proporcionando la primera línea de protección frente a los patógenos (Bendelac y Fearon, *Curr Opin Immunol* 9: 1-3 (1997)). También, está bien establecida la participación de estas células en diversos procesos inflamatorios agudos y crónicos (O'Shea y Murray, *Immunity* 28: 477-487 (2008)). Además, el vínculo entre las células inflamatorias y el cáncer que originalmente se proponía en el siglo XIX ha recibido recientemente amplio respaldo experimental y clínico (revisado en Coussens y Werb, *Nature* 420: 860-867 (2002); Lin y Karin, *J Clin Invest* 117: 1175-1 183 (2007)). La secreción de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias puede promover de forma directa el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Además, las células mieloides infiltrantes de tumor pueden facilitar el crecimiento tumoral en virtud de su capacidad de regular de forma negativa las respuestas inmunitarias en los subtipos de linfocitos T, que incluyen células CD4⁺ y CD8⁺, de allí la denominación de células supresoras derivadas mieloides (CSDM) para por lo menos un subconjunto de células CD11b⁺Gr1⁺ (revisado en Talmadge JE, *Clin Cancer Res* 3: 5243-5248 (2007)).

Estudios recientes han probado la hipótesis de que las células mieloides pueden desempeñar un papel en la mediación de la insensibilidad a agentes bloqueantes de VEGF en modelos tumorales (Shojaei *et al.*, *Nature Biotechnology* 25: 911-920 (2007)). Los tumores insensibles a anti VEGF se asociaron con un aumento significativo de la frecuencia de células CD11b⁺Gr1⁺ infiltrantes de tumor, en comparación con las sensibles (Shojaei *et al.*, citado anteriormente). En la evaluación del mecanismo de la angiogénesis independiente de VEGF que median las células CD11b⁺ Gr1⁺, se identificó como un regulador crítico al ortólogo de la proteína Bv8 secretada (Shojaei *et al.*, *Nature* 450: 825-831 (2007)). Estos estudios, que incluyen los datos proporcionados en el Ejemplo 1, proporcionaron pruebas de que Bv8 es un mediador de la movilización de células mieloides y de la angiogénesis durante el desarrollo tumoral, no sólo en xenoinjertos (Shojaei *et al.*, *Nature*, 2007, citado anteriormente) sino también en un modelo de ratón transgénico de evolución de cáncer (Shojaei *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2640-2645 (2008)).

El presente estudio se dirigió a la caracterización de la expresión de Bv8 en médula ósea y en células sanguíneas maduras de ser humano. Los análisis de los inventores indican que la regulación por diversas citocinas de la expresión de Bv8 en células sanguíneas de ser humano es específica de tipo celular. De forma similar al ratón, la mayor expresión de Bv8 fue en las células de médula ósea y en neutrófilos, se detectó aunque un menor nivel en monocitos y linfocitos. Para verificar que la proteína Bv8 es biológicamente activa, Bv8 se purificó de forma parcial a partir de neutrófilos de ser humano y se documentó su actividad en un bioensayo. Además, en el presente estudio se identificó una actividad nueva de Bv8, la capacidad de promover la migración de neutrófilos *in vitro* a concentraciones muy bajas, lo que sugiere que Bv8, potencialmente de fuentes que no sean neutrófilos, puede regular fisiológicamente la migración de neutrófilos. Además, los presentes resultados muestran que, de los dos receptores para Bv8, solo PKR2/EG-VEGFR2 se expresó tanto en neutrófilos de ser humano como en células movilizadas por G-CSF aisladas, lo que sugiere que en efecto este es el principal receptor implicado en los efectos hematopoyéticos de Bv8.

G-CSF fue el principal inductor de la expresión de Bv8 en neutrófilos y en células de la médula ósea, aunque no tuvo efecto sobre monocitos y linfocitos. Hay que resaltar que la regulación positiva de Bv8 pudo demostrarse *in vivo*, como se evaluó por la expresión aumentada en sangre periférica de donantes tratados con G-CSF. Las células estromales, los fibroblastos y las células endoteliales pueden generar G-CSF dentro del microentorno tumoral. La regulación positiva de Bv8 mediante GM-CSF en neutrófilos de ser humano y en células de médula ósea, fue interesante debido a que este factor no causa tal efecto en células mononucleares de ratón. De hecho, se sabe que G-CSF y GM-CSF modulan la proliferación, diferenciación, supervivencia y maduración de neutrófilos y monocitos de la médula ósea. También, diversas células no hematopoyéticas pueden producir ambos factores, que incluyen fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos y células tumorales. Además, varios informes sugieren que los factores estimulantes de colonias pueden promover el crecimiento maligno, por lo menos en sistemas experimentales (Karcher *et al.*, *Int J Cancer* 118: 2182-2189 (2006); Morales-Arias *et al.*, *Cancer* 110: 1568-1577 (2007); Okazaki *et al.*, *International Immunology* 18: 1-9 (2006)).

IL-10 y SDF-1 α significativamente regularon de forma positiva la expresión de Bv8 en monocitos de ser humano. En linfocitos, IL-10 fue el principal inductor de la expresión de Bv8. Cabe destacar que muchas pruebas respaldan un papel de los macrófagos y linfocitos infiltrantes de tumor en la secreción de factores angiogénicos tales como VEGF (Freeman *et al.*, *Cancer Res* 55: 4140-4145 (1995); Lewis y Murdoch, *Am J Pathol* 167-627-635 (2005)). Por lo tanto, la Bv8 que producen estos tipos celulares puede contribuir a la angiogénesis y podría tener también papeles reguladores adicionales que todavía tienen que definirse. Descrita originalmente como una citocina que producen los linfocitos T auxiliares 2 (Th2) (Boyman *et al.*, *Curr Opin Immunol* 19: 320-326 (2007)), se ha implicado a IL-10 en la angiogénesis (Silvestre *et al.*, *Circ Res.* 87: 448-452 (2000); Sakamoto *et al.*, *Int J Cancer* 118: 1909-1914 (2006)).

En conclusión, los estudios de los inventores demostraron que la expresión y la regulación de Bv8 en células hematopoyéticas de ser humano se conservan esencialmente en comparación con el ratón, proporcionando la base para la investigación adicional del papel patofisiológico de Bv8 en tumores ser humano y en trastornos inflamatorios, y para la aplicación terapéutica de los inhibidores de Bv8.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera como las realizaciones

específicas, debe comprenderse que tales realizaciones no limitan a la invención.

A lo largo de la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones, la expresión “que comprende” se utiliza como una frase de transición inclusiva ilimitada, que no excluye elementos o etapas de métodos adicionales no enumerados.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.
Napoleon Ferrara Farbod Shojaei Xiumin Wu Cuiling Zhong

10 <120> INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

<130> GNE-0256PCT

15 <140> Todavía no asignado
<141> Incluido aquí

<150> 60/974.382
<151> 21-09-2007

20 <150> 61/083.071
<151> 23-07-2008

<160> 37

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 427
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

tgagggcgcc atgaggagcc tgtgctgcgc cccaactcctg ctcctcttgc tgctgcccgc	60
gctgctgctc acgccccgcg ctggggaagc cgccgtgatc accggggcctt gtgacaagga	120
ctcccaatgt ggtggaggca tgtgctgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat	180
ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aaaacaattt	240
tggaaatgga aggcaggaaa gaagaaagag gaagagaagc aaaaggaaaa aggaggttcc	300
atTTTTTggg cggaggatgc atcacacttg cccatgtctg ccaggcttgg cctgTTTtagc	360
gacttcattt aaccgattta tttgTTTtagc ccaaaagtaa tcgctctgga gtagaaacca	420
aatgtga	427

35 <210> 2
<211> 129
<212> PRT
40 <213> *Homo sapiens*

<400>2

ES 2 568 881 T3

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

Lys

5 <210> 3
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400>3

gagggcgcca tgaggagcct gtgctgccc ccaactctgc tctcttctgct gctgccgcgc 60
 ctgctgctca cgccccgcgc tggggaagcc gccgtgatca cggggccttg tgacaaggac 120
 tcccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct gtcagtatct gggtaagag cataaggatt 180
 tgcaacacta tgggcaaact gggagacagc tgccatccac tgactcgtaa agttccattt 240
 tttgggcgga ggatgatca cacttgccca tgtctgccag gcttgccctg tttacggact 300
 tcatttaacc gatttatctg tttagcccaa aagtaatcgc tctggagtag aaaccaaatg 360
 tga 363

10 <210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 568 881 T3

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
 20 25 30

Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
 35 40 45

Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu
 50 55 60

Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg
 85 90 95

Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys
 100 105

5 <210> 5
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> *Mus* sp.

10 <400>5

ES 2 568 881 T3

cggacgcgtg ggcgtccctt aaccgccacc gcgtccccgg gacgccatgg gggacccgcg 60
 ctgtgccccg ctactgttac ttctgtctgt accgctgctg ttcacaccgc ccgccgggga 120
 tgccgcggtc atcaccgggg cttgcgacaa ggactctcag tgcggaggag gcatgtgctg 180
 tgctgtcagt atctgggta agagcataag gatctgcaca cctatgggcc aagtgggcga 240
 cagctgccac ccctgactc ggaaagttcc attttggggg cggaggatgc accacacctg 300
 ccctgactg ccaggcttgg cgtgtttaag gacttctttc aaccggttta tttgcttggc 360
 ccggaaatga tcaactctgaa gtaggaactt gaaatgcgac cctccgctgc acaatgtccg 420
 tcgagtctca cttgtaattg tggcaaacia agaatactcc agaaagaaat gttctcccc 480
 ttccttgact ttccaagtaa cgtttctatc tttgattttt gaagtggctt ttttttttt 540
 ttttttttcc tttccttgaa ggaaagtttt gatttttggg gagatttata gaggactttc 600
 tgacatggct tctcatttcc ctgtttatgt tttgccttga catttttgaa tgccaataac 660
 aactgttttc acaaatagga gaataagagg gaacaatctg ttgcagaaac ttccttttgc 720
 cctttgcccc actcgccccg ccccgccccg ccccgccctg cccatgcgca gacagacaca 780
 cccttactct tcaaagactc tgatgatcct caccttactg tagcattgtg ggtttctaca 840
 cttccccgcc ttgctggtgg acccactgag gaggctcaga gagctagcac tgtacaggtt 900
 tgaaccagat cccccaagca gctcatttgg ggcagacggt gggagcgctc caggaacttt 960
 cctgcaccca tctggccca cggctttcag ttctgtctgt taactggtgg gaggacaaaa 1020
 ttaacgggac cctgaaggaa cctggcccgt ttatctagat ttgtttaagt aaaagacatt 1080
 ttctccttgt tgtggaatat tacatgtctt tttctttttt atctgaagct tttttttttt 1140
 ttctttaagt cttcttgttg gagacatttt aaagaacgcc actcgaggaa gcattgattt 1200
 tcatytggca tgacaggagt catcatttta aaaaatcggg gtttaagttat aatttaaact 1260
 ttatttgtaa cccaaagty taatgtaaat ggatttctctg atatcctgcc atttgtactg 1320
 gtatcaatat ttytatgt 1338

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

5

<400> 6

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 5
 <400> 10
 atggcacgga agctagga 18
 <210> 11
 10 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 11
 gcagagctga agtctcttg a 21
 20 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"
 <400> 12
 30 tgctgctgga cccttctaa acct 24
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 13
 40 cagcgacat gaagactg 19
 <210> 14
 <211>21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 50 <400> 14
 gtcatcttcg gtttcctgag t 21
 <210> 15
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"
 <400> 1
 tccaggcagc acccctgatg 20
 <210> 16
 65 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 5
 <400> 16
 gaactccacg tgagcgca 18
 <210> 17
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 17
 gggccccatg ttgatgatgc 20
 20 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"
 <400> 18
 30 ctccctgata cacaccagcc cacctg 26
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 19
 40 ctggaaggct tctacaatg g 21
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 20
 50 ggcatcccaa ttgtctga 19
 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"
 60 <400> 21
 tccaggtctg cactggactt accg 24
 <210> 22
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

5 <400> 22
 tcaccatcgt tcgtgactc 20

<210> 23
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15 <400> 23
 agaaggcagt gaggtagtgc tt 22

<210> 24
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

25 <400> 24
 tccttcacga acacagtggg gaa 23

<210> 25
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 25
 40 aggtcaaagg gaatgtgttc aaa 23

<210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 26
 50 ccttgctgc cttcagcttg t 21

<210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

<400> 27
 60 acaagcgcac cctcatggag cacatc 26

<210> 28
 <211> 15
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

5 <400> 28
 cgcaagcgcc gtgaa 15

<210> 29
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15 <400> 29
 ggtctctcc tcctggata aagtc 25

<210> 30
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

25 <400> 30
 ccaggccaag aaggaggaga tcatca 26

<210>31
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 31
 40 aatgacgagg gcctggagt 19

<210> 32
 <211>21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 32
 50 ttgatccgca taatctgcat g 21

<210> 33
 <211> 26
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

<400> 33
 60 tgtgcccact gaggagtcca acatca 26

<210> 34
 <211> 4
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 568 881 T3

<220>
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 34
5
Gly Ser Gly Ser
1
<210> 35
<211> 4
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
15 <400> 35
Gly Gly Gly Ser
1
20 <210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Etiqueta de 6x His sintética"
<400> 36
His His His His His His
30 1 5
<210> 37
<211> 130
35 <212> PRT
<213> *Mus* sp.
<400> 37

ES 2 568 881 T3

Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Phe Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
 20 25 30

Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
 35 40 45

Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val
 50 55 60

Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Ser His Val Ala Asn Gly
 65 70 75 80

Arg Gln Glu Arg Arg Arg Ala Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val
 85 90 95

Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro
 100 105 110

Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala
 115 120 125

Arg Lys
 130

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti Bv8 o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de tratamiento de tumor en un sujeto humano que tiene un tumor tratado previamente con un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), comprendiendo el método administrar (i) el anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo y (ii) un anticuerpo anti VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 10 2. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es insensible al tratamiento con dicho antagonista de VEGF.
- 15 3. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 20 4. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 3, en donde el antagonista de VEGF es bevacizumab.
- 25 5. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de cualquier reivindicación anterior, el cual es un anticuerpo monoclonal anti Bv8 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 30 6. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo monoclonal anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo son quiméricos, humanizados o humanos.
- 35 7. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo anti VEGF que se administra es bevacizumab.
- 40 8. El anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el método comprende adicionalmente someter a dicho sujeto humano a quimioterapia o a terapia de radiación.
- 45 9. Un anticuerpo anti VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un método de tratamiento de tumor en un sujeto humano que tiene un tumor tratado previamente con un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), comprendiendo el método administrar (i) el anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo y (ii) un anticuerpo anti Bv8 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 50 10. El anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 9, en donde el tumor es insensible al tratamiento con dicho antagonista de VEGF.
- 55 11. El anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 60 12. El anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 11, en donde el antagonista de VEGF es bevacizumab.
13. El anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el anticuerpo anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo son un anticuerpo monoclonal anti Bv8 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
14. El anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo monoclonal anti Bv8 o el fragmento de unión a antígeno del mismo son quiméricos, humanizados o humanos.
15. El anticuerpo anti VEGF para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, el cual es bevacizumab.
16. El anticuerpo anti VEGF o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el método comprende adicionalmente someter a dicho sujeto humano a quimioterapia o a terapia de radiación.

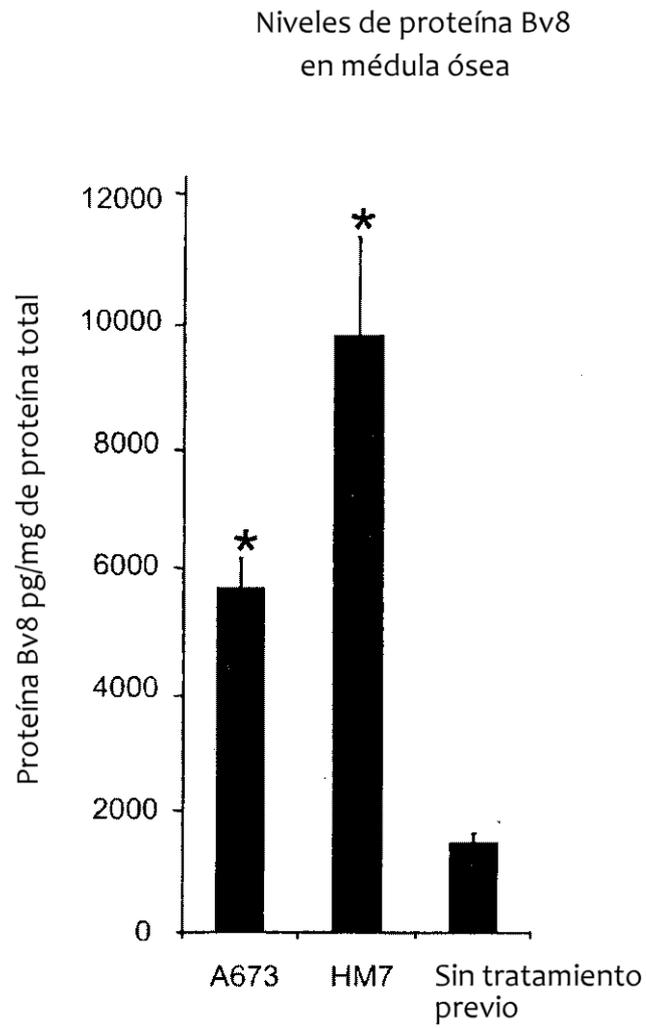


FIG. 1a

Expresión de Bv8 en células mieloides de MO

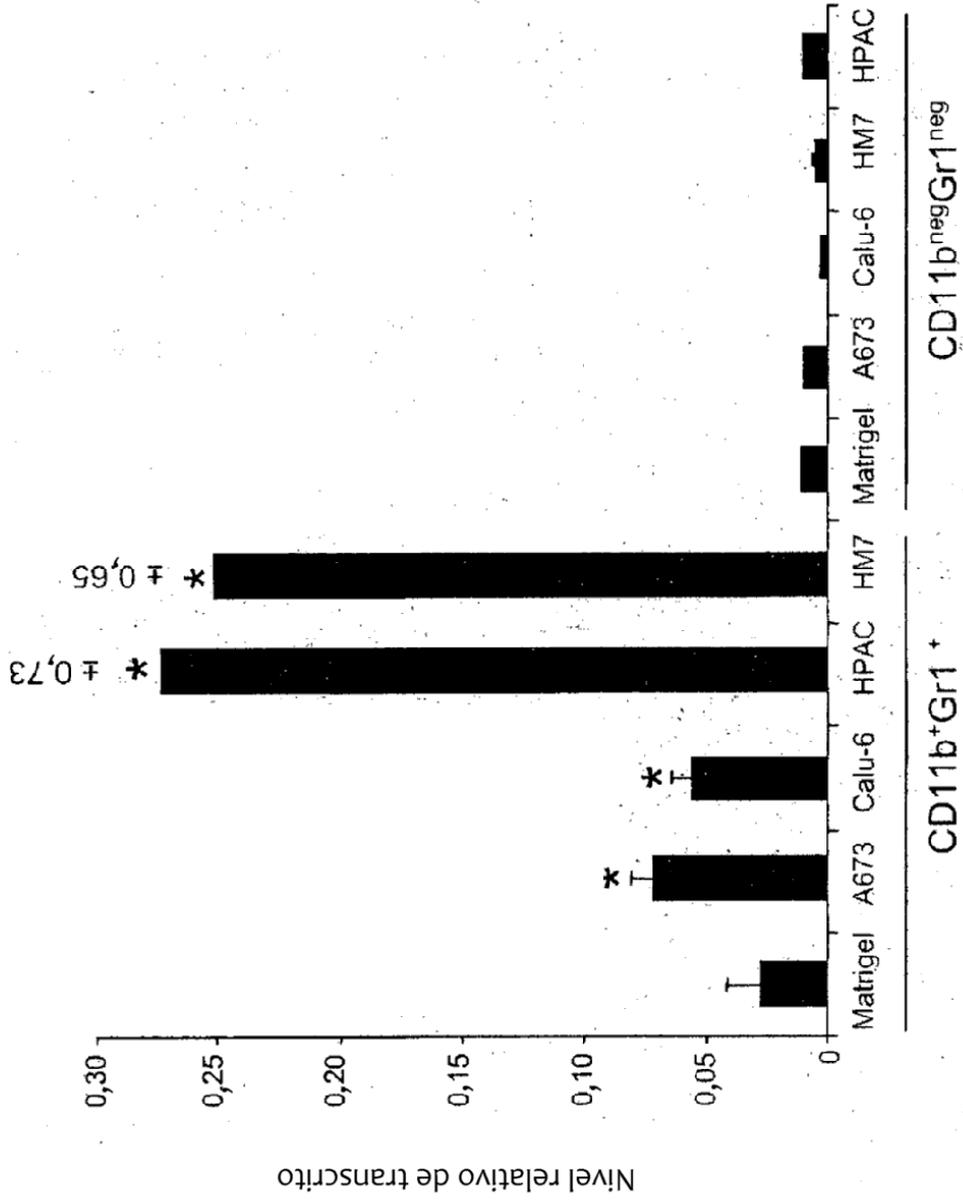


FIG. 1b

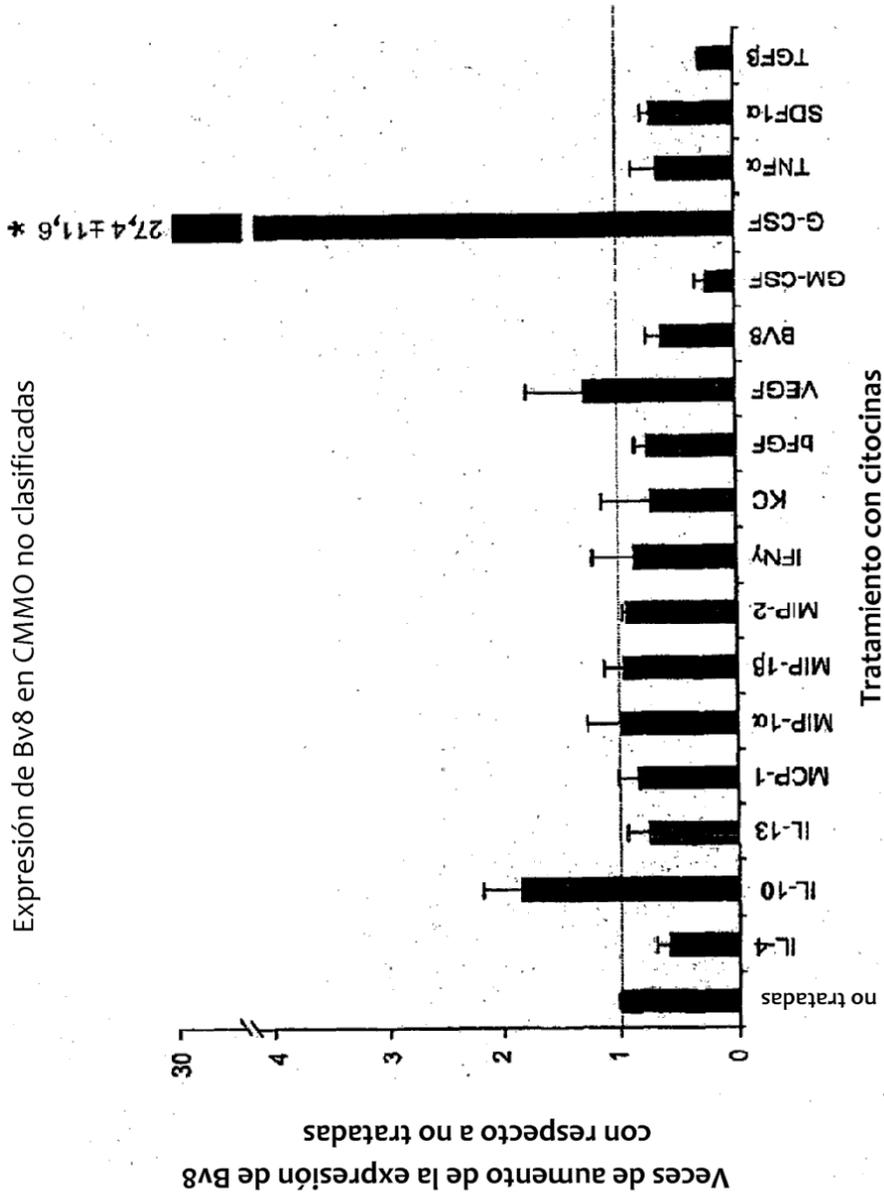
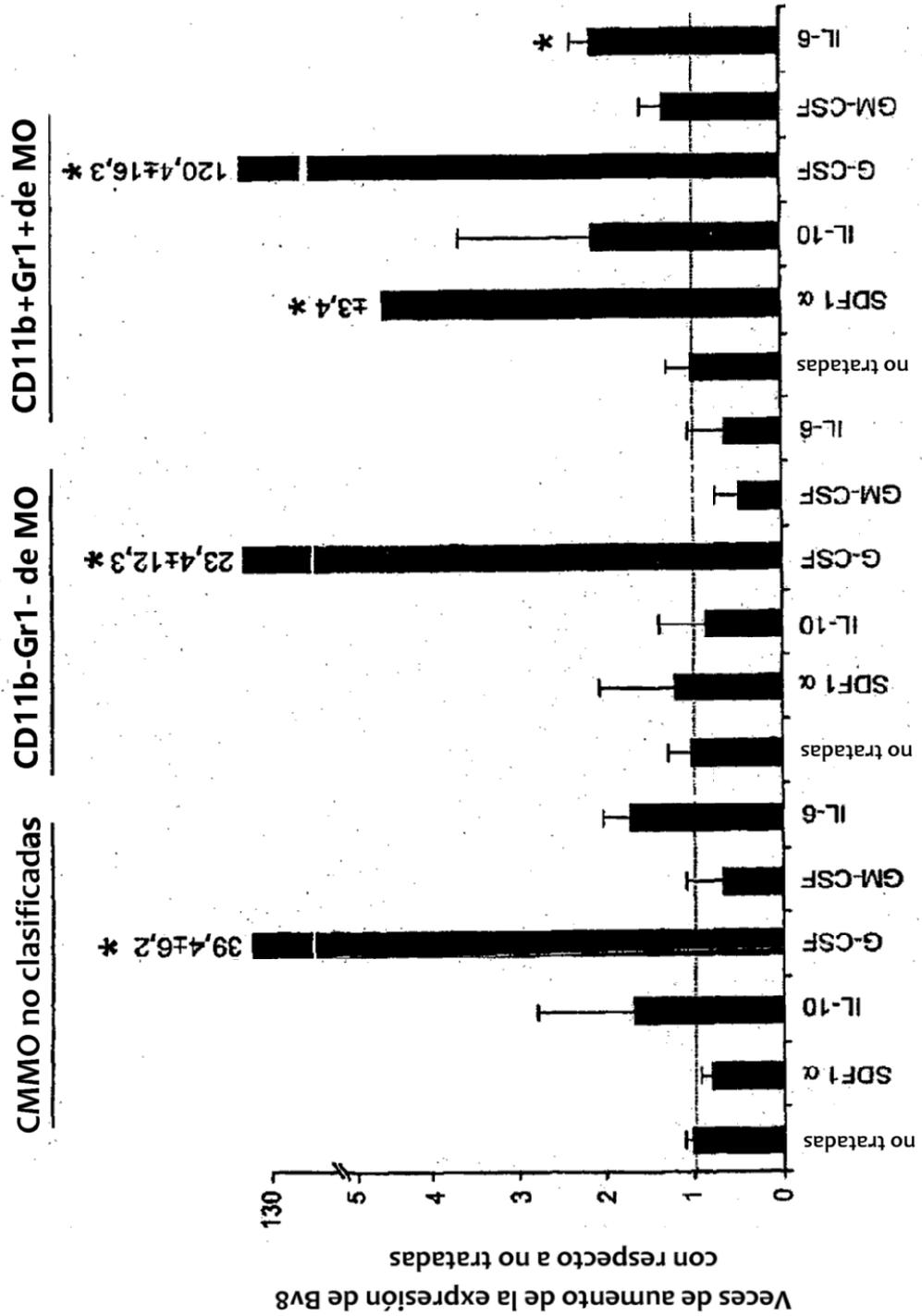


FIG. 1c



Tratamiento con citocina

FIG. 1d

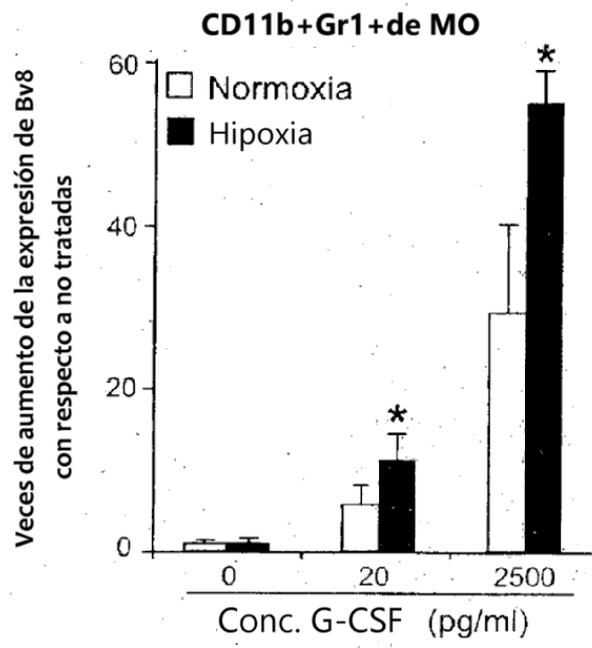


FIG. 1e

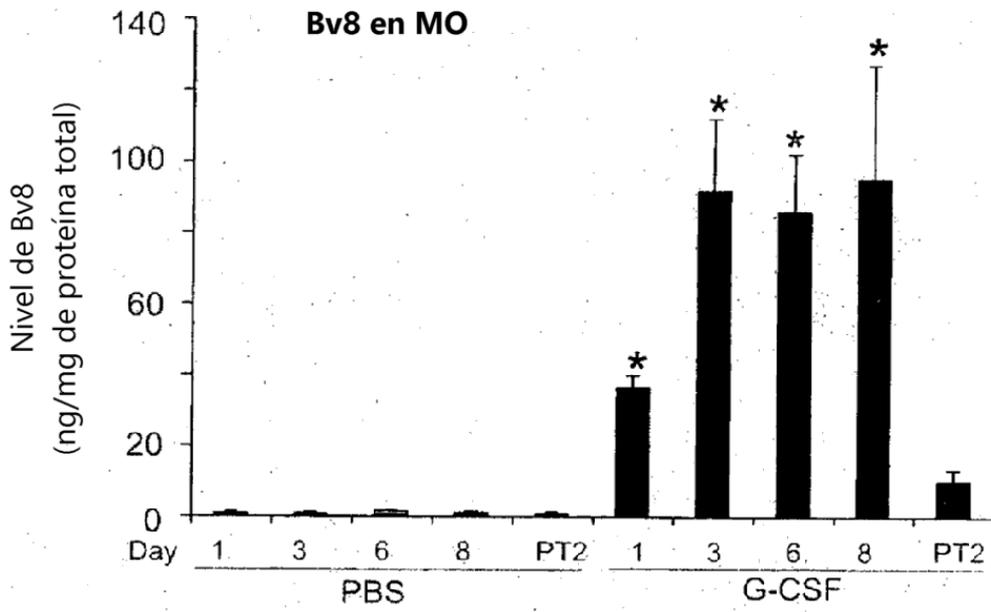


FIG. 1f

Tratamiento anti GCSF en CMMO incubadas con lisado tumoral

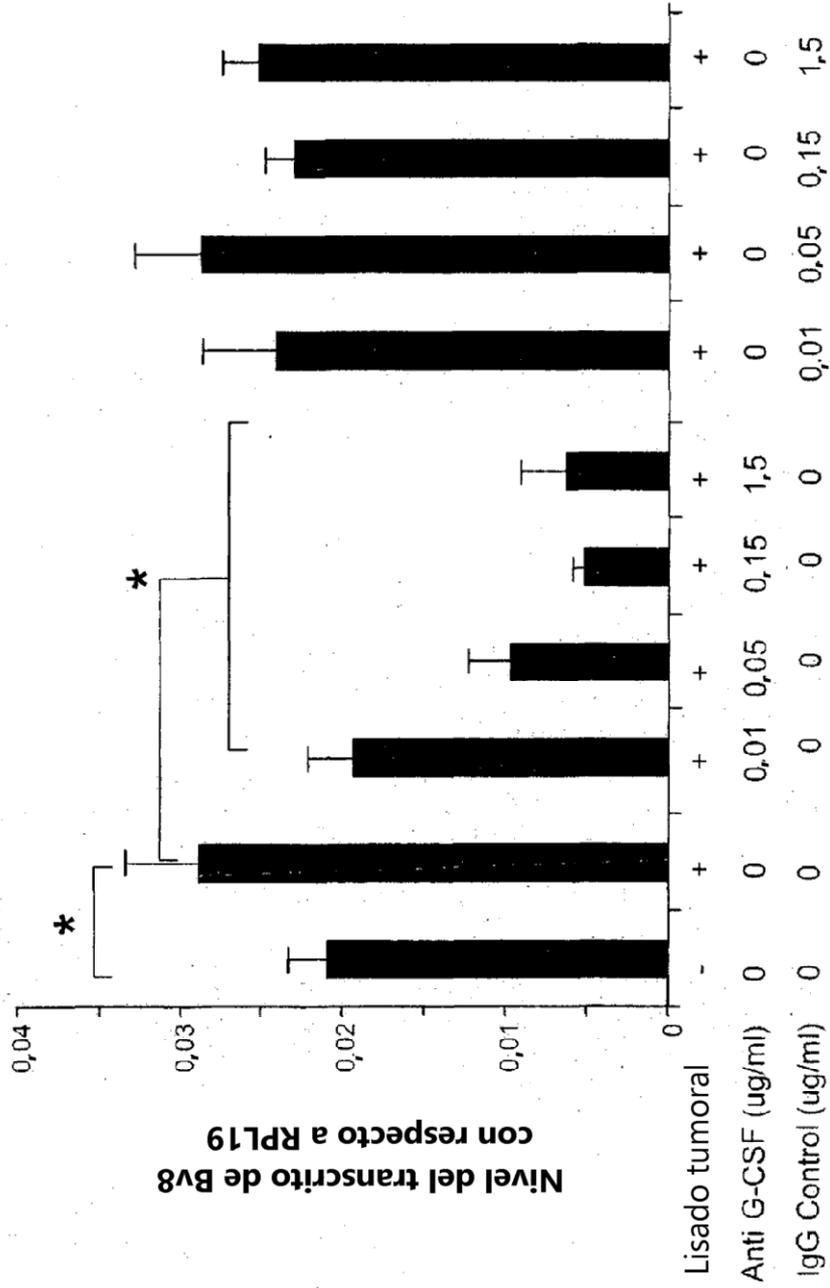


FIG. 1g

Niveles de Bv8 en la MO de ratones que tienen tumor HM7

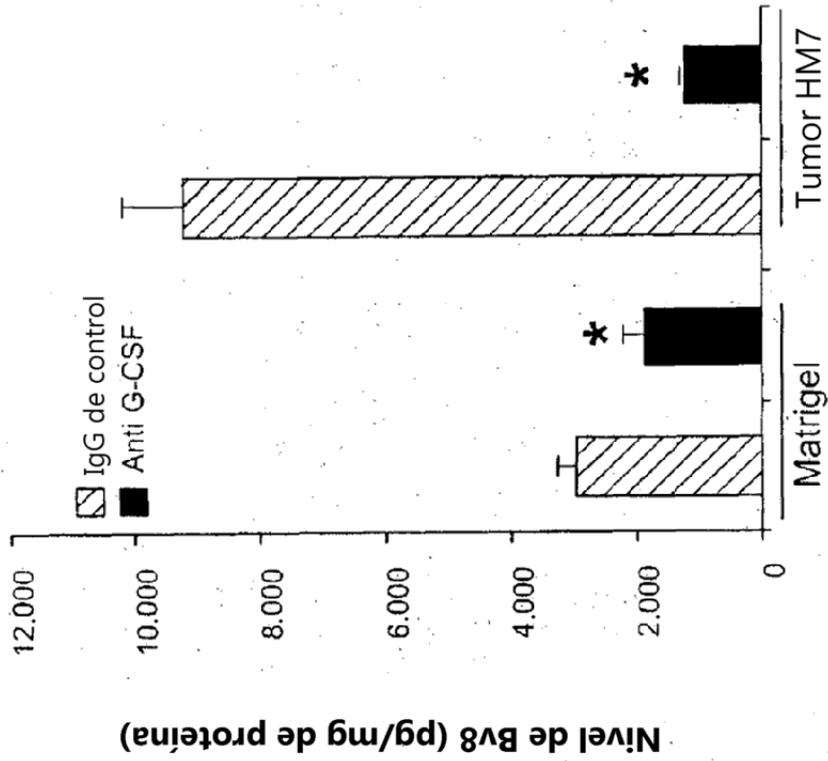


FIG. 1i

Niveles de Bv8 en la MO de ratones que no tienen tumor

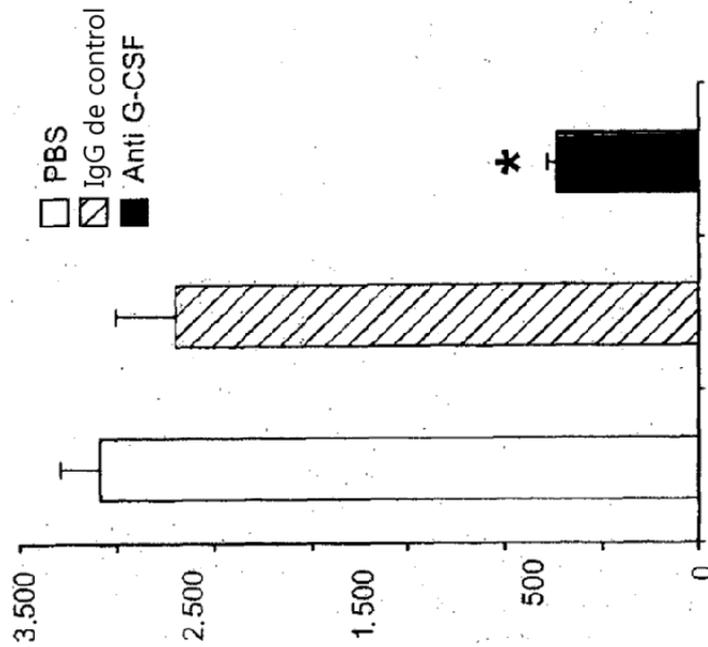


FIG. 1h

Efecto del tratamiento anti Bv8 sobre la movilización de CD11b+Gr1 + que induce G-CSF

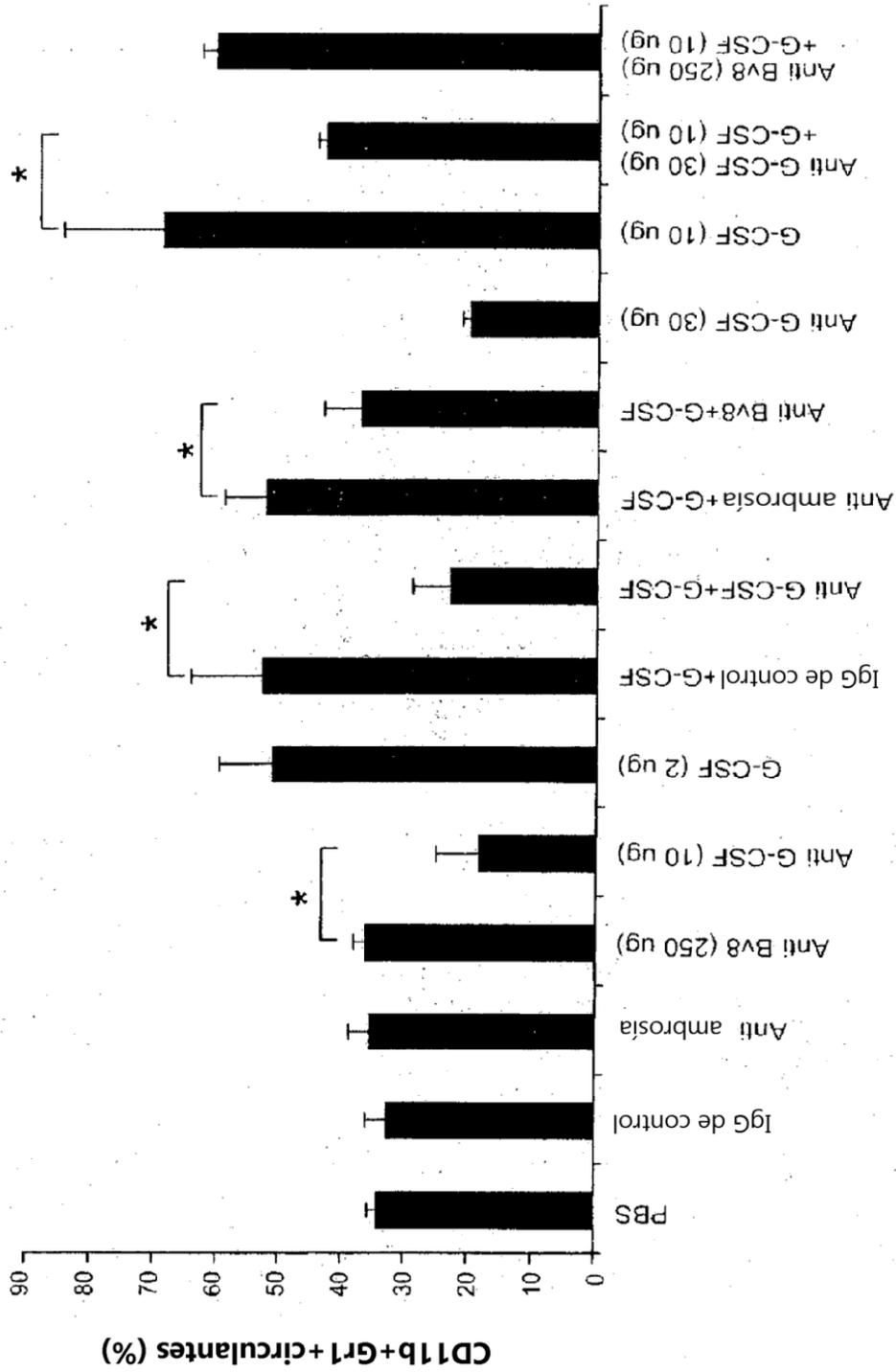


FIG. 1j

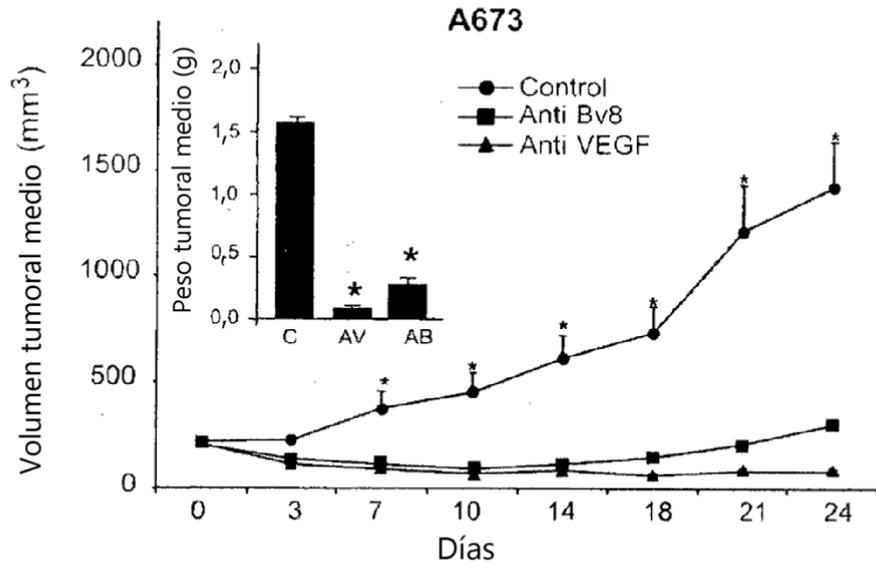


FIG. 2a

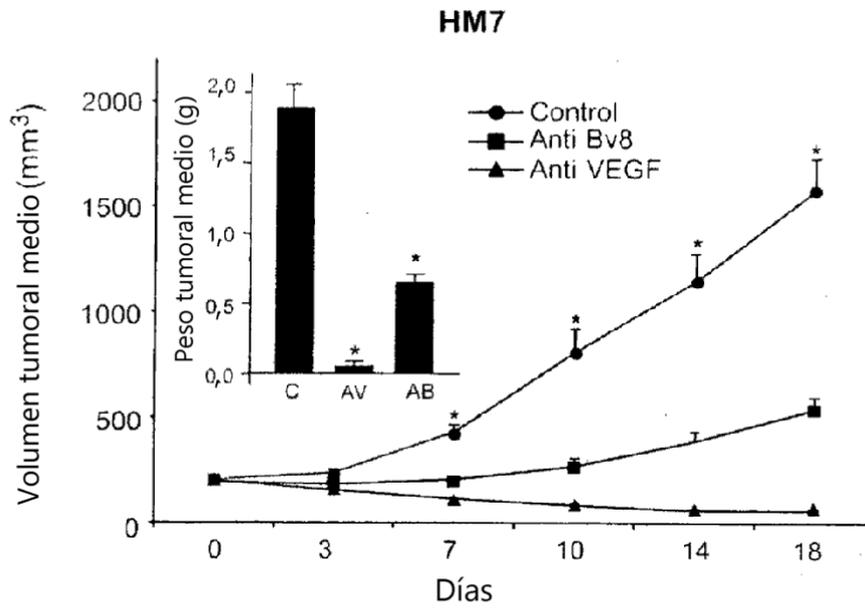


FIG. 2b

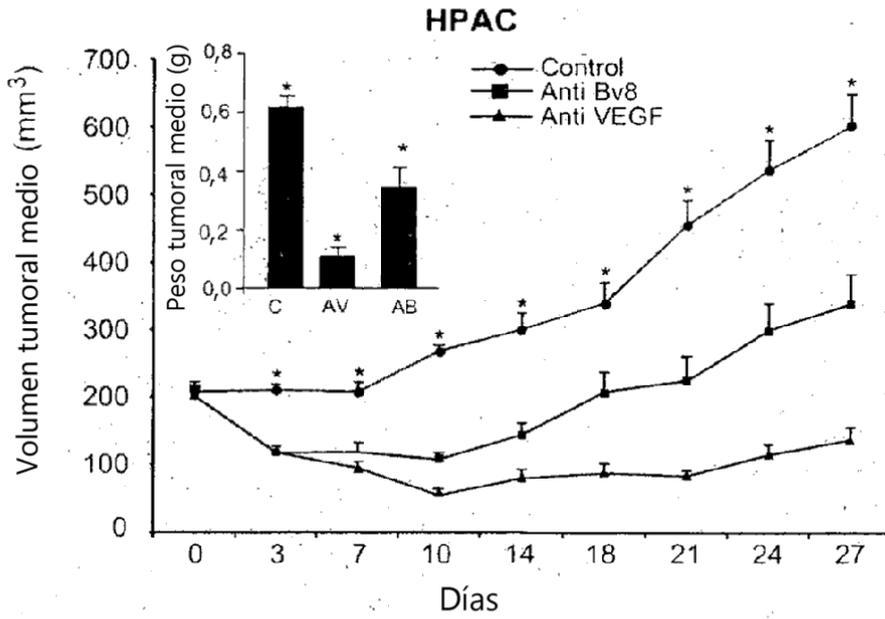


FIG. 2c

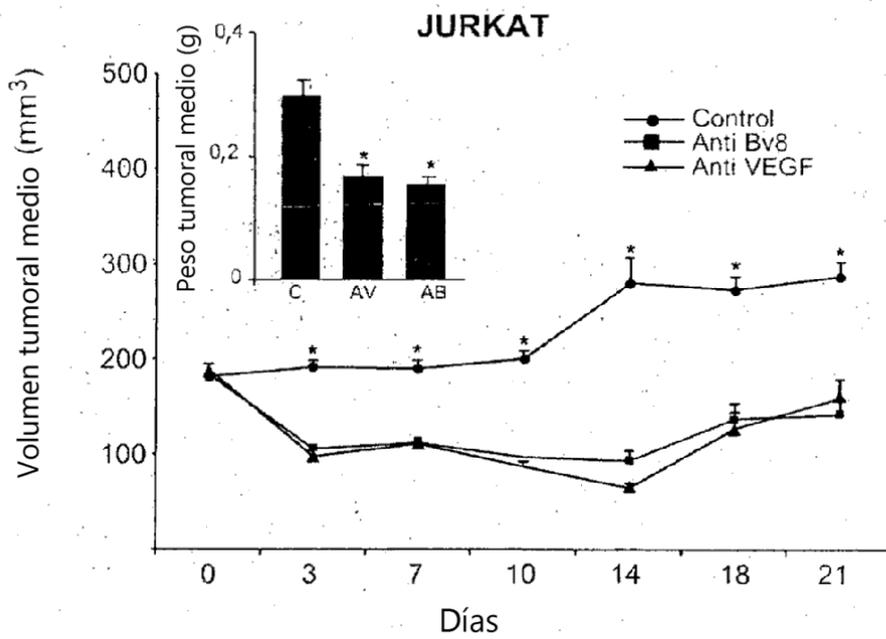


FIG. 2d

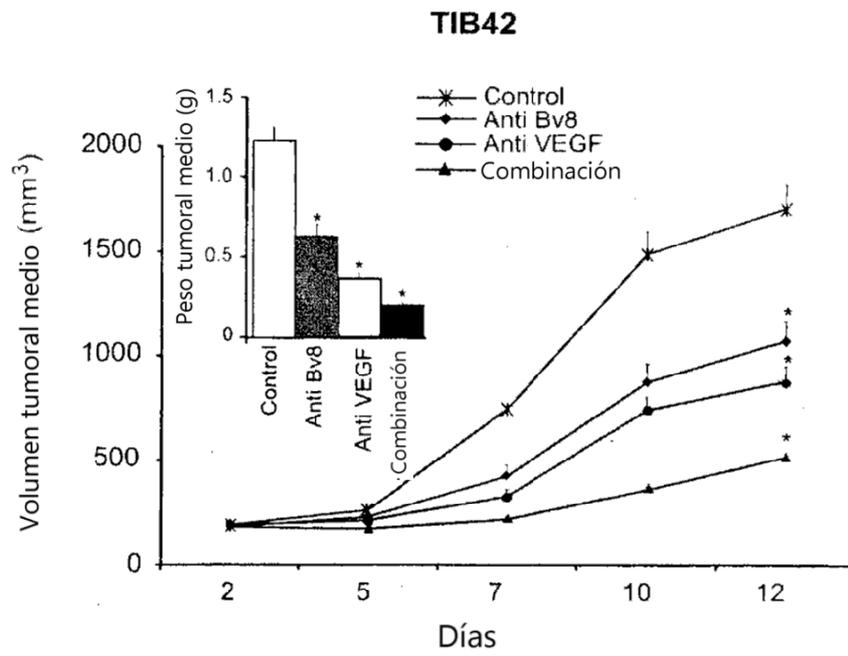


FIG. 2e

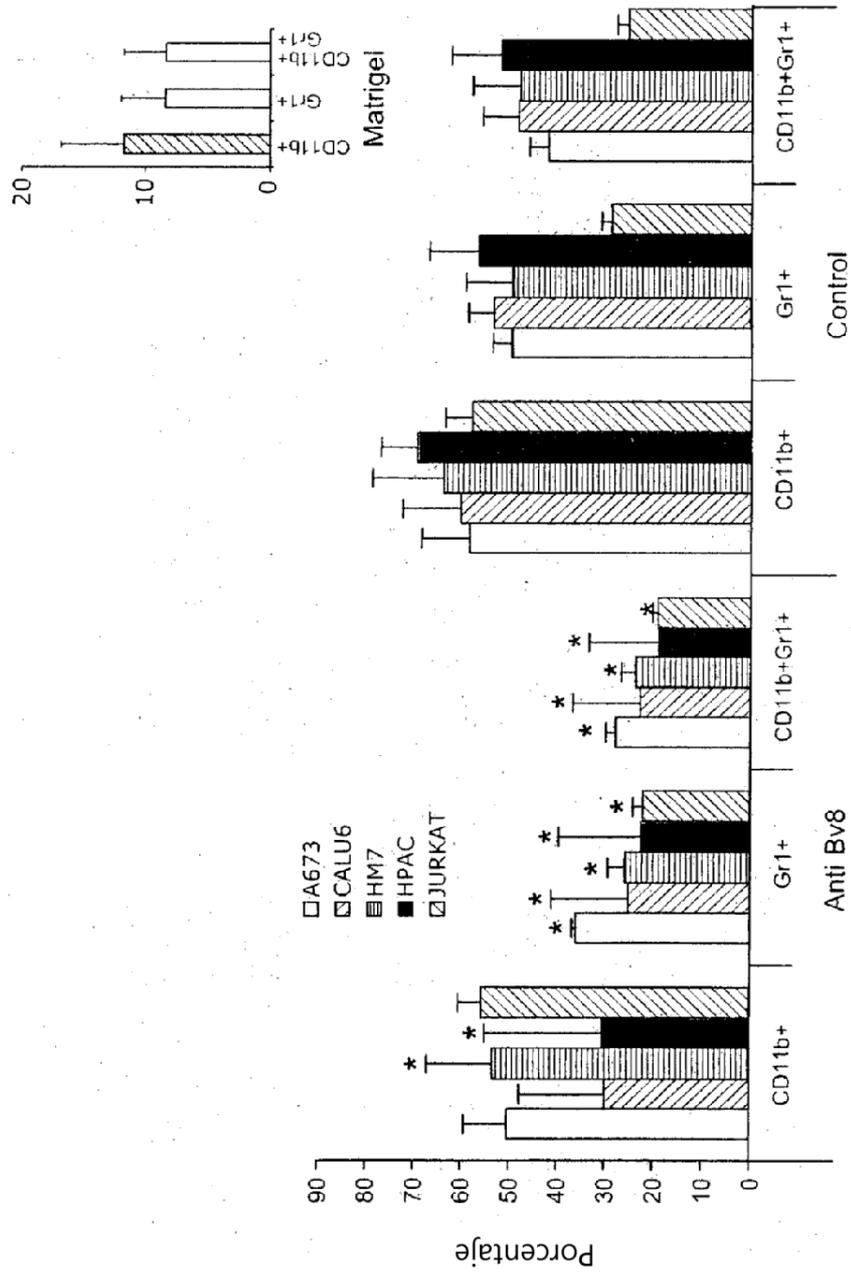


FIG. 3a
Sangre periférica

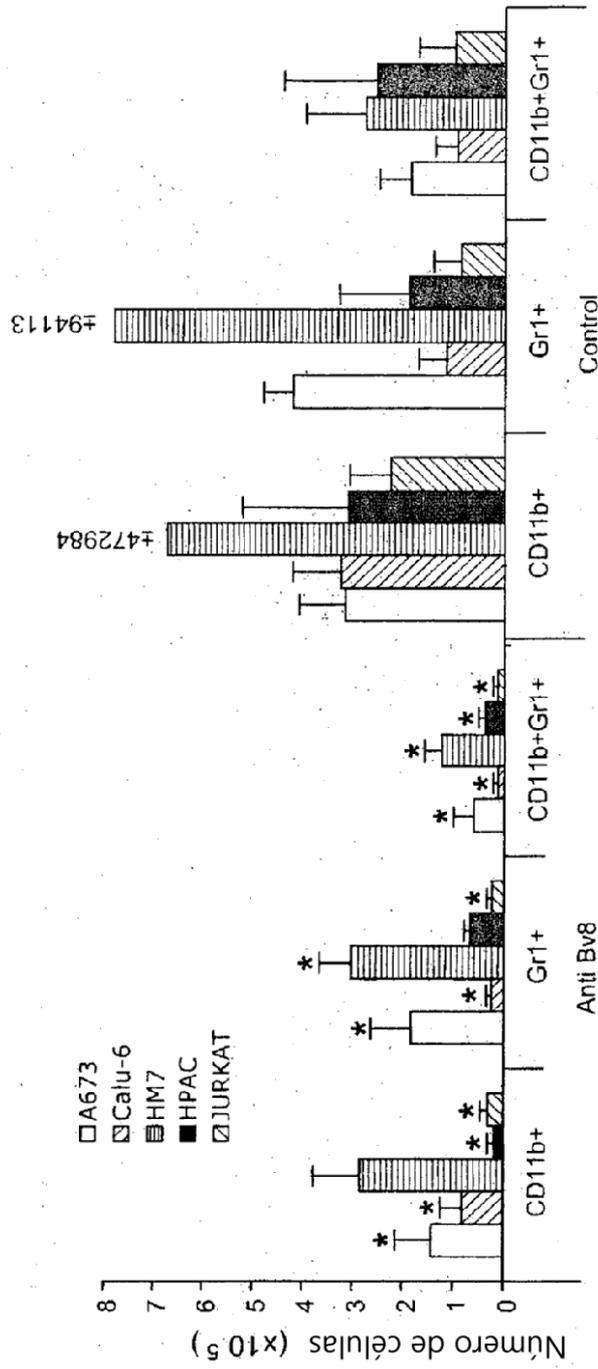


FIG. 3b
Tumor

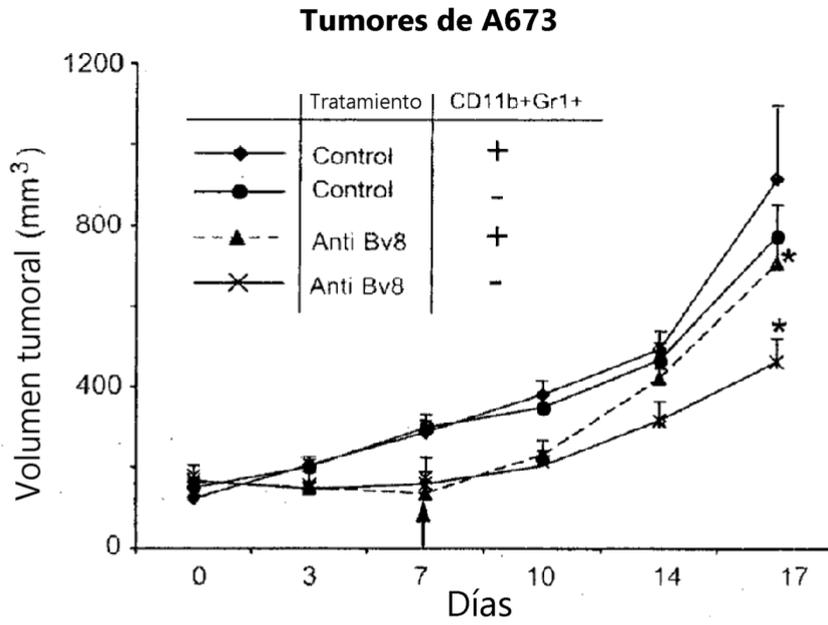


FIG. 3c

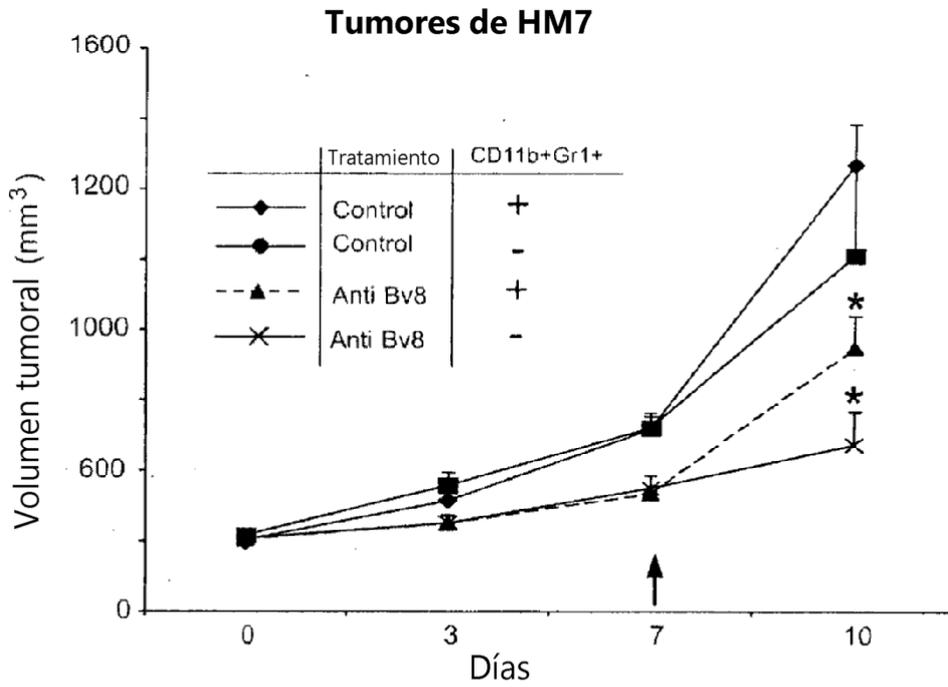
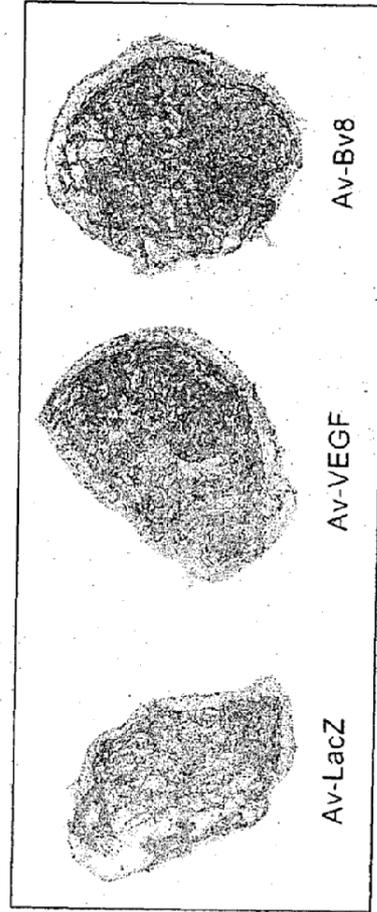
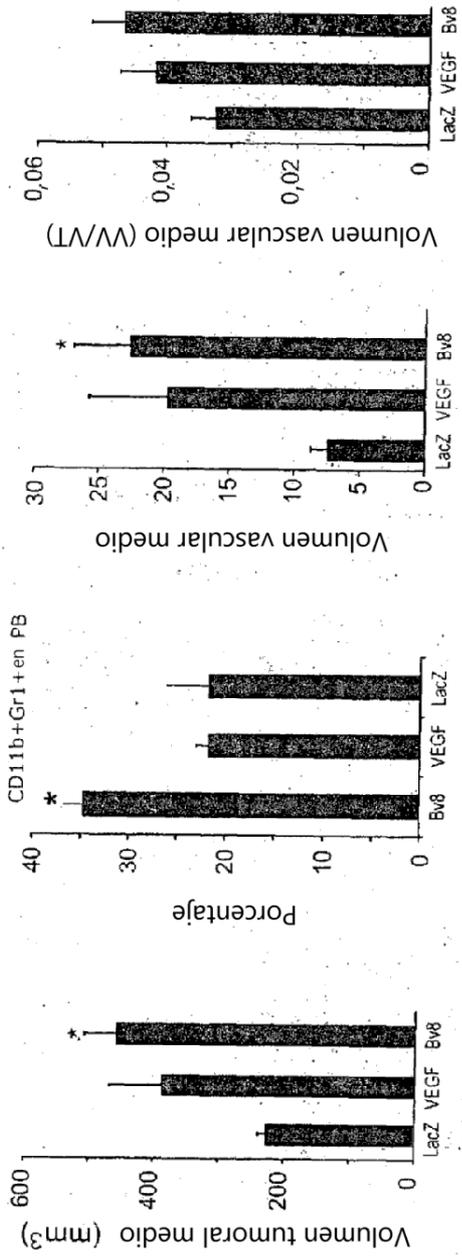


FIG. 3d



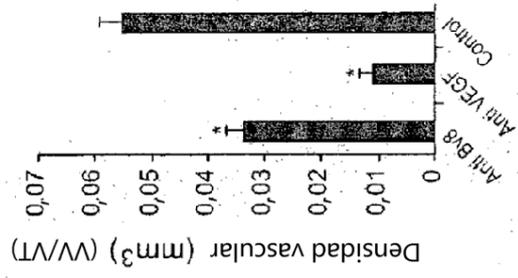


FIG. 4i

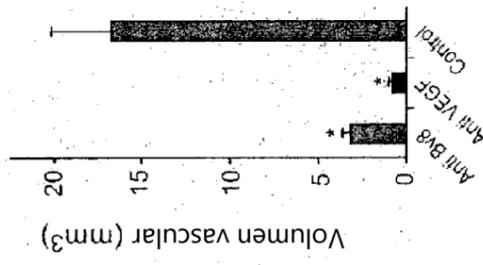


FIG. 4h

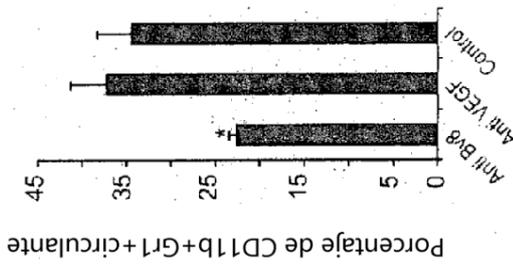


FIG. 4g

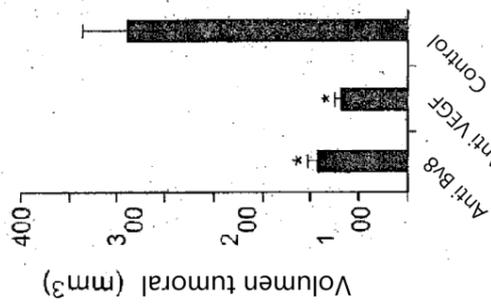


FIG. 4f

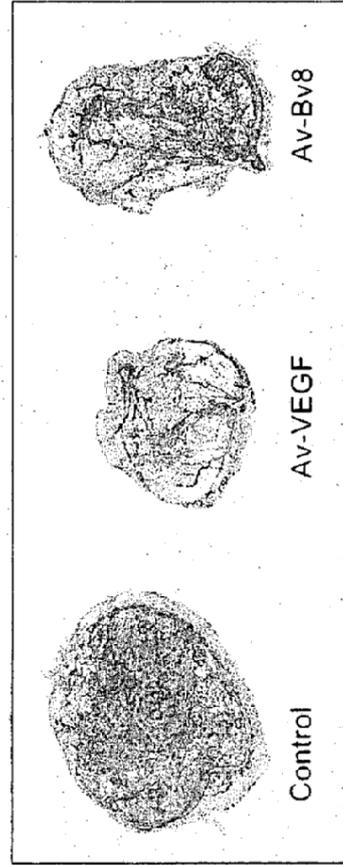


FIG. 4j

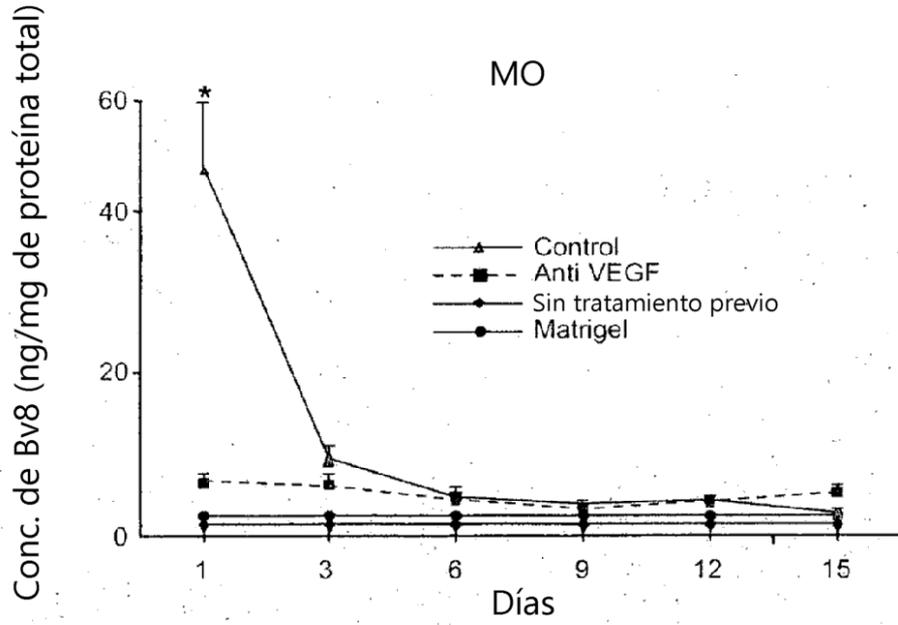


FIG. 5a

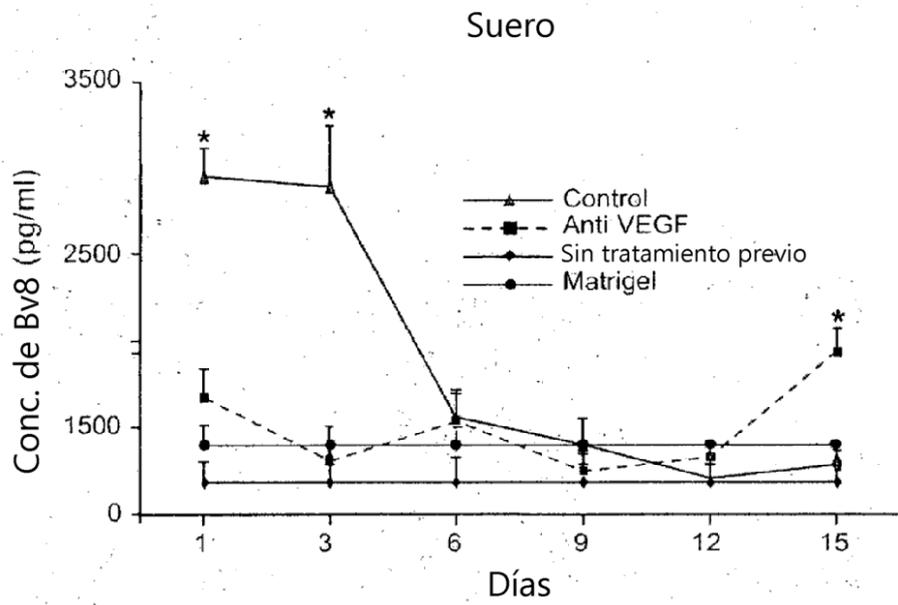


FIG. 5b

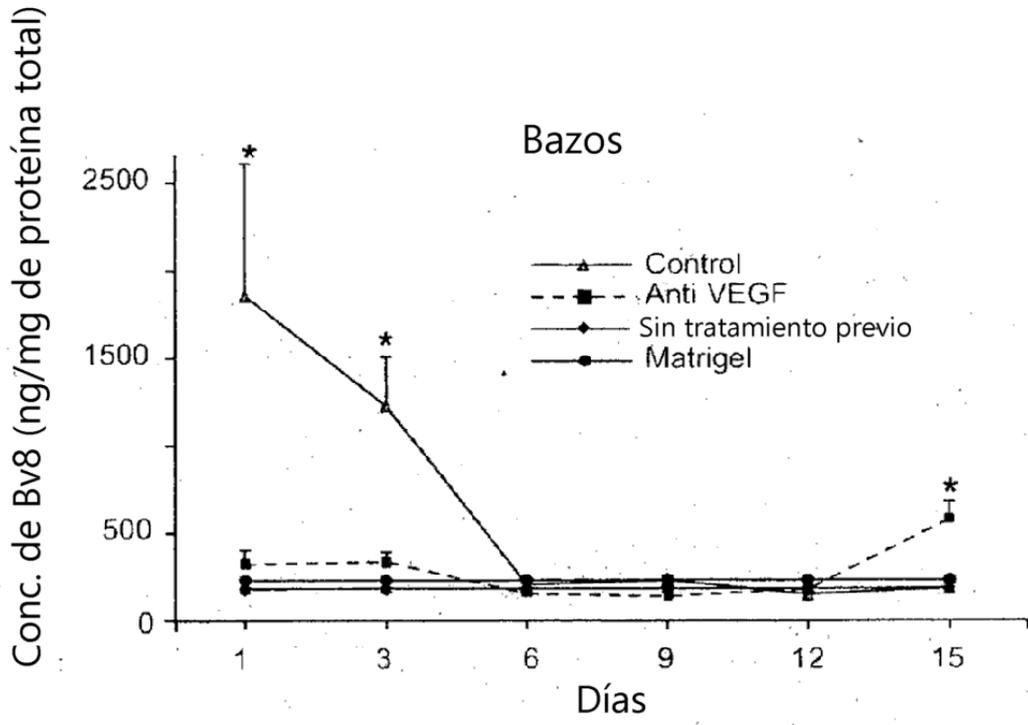


FIG. 5c

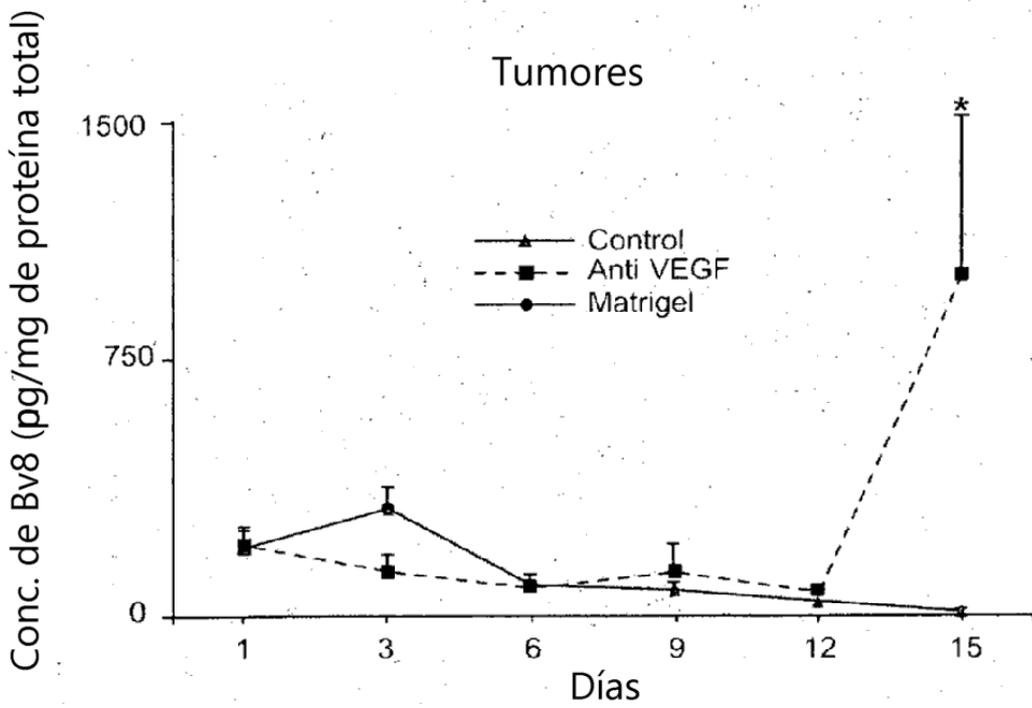


FIG. 5d

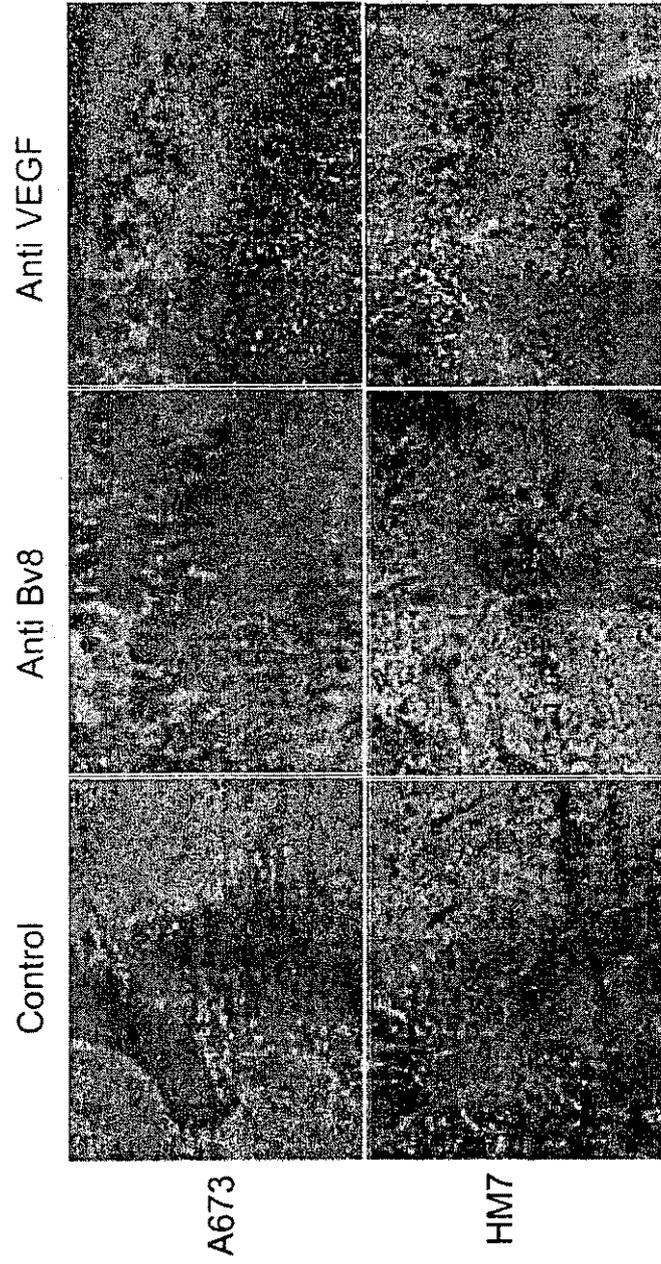


FIG. 5e

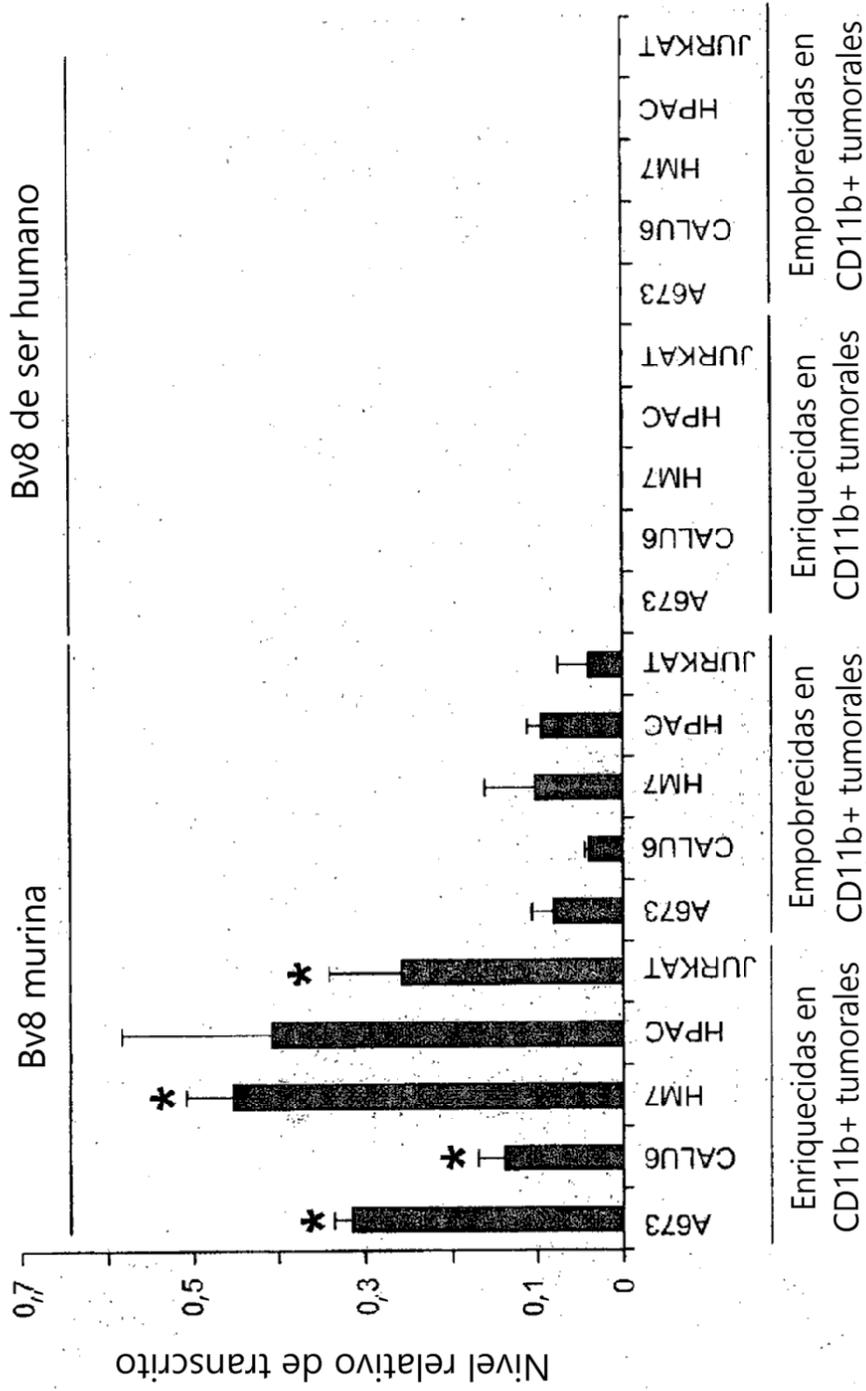


FIG. 5f

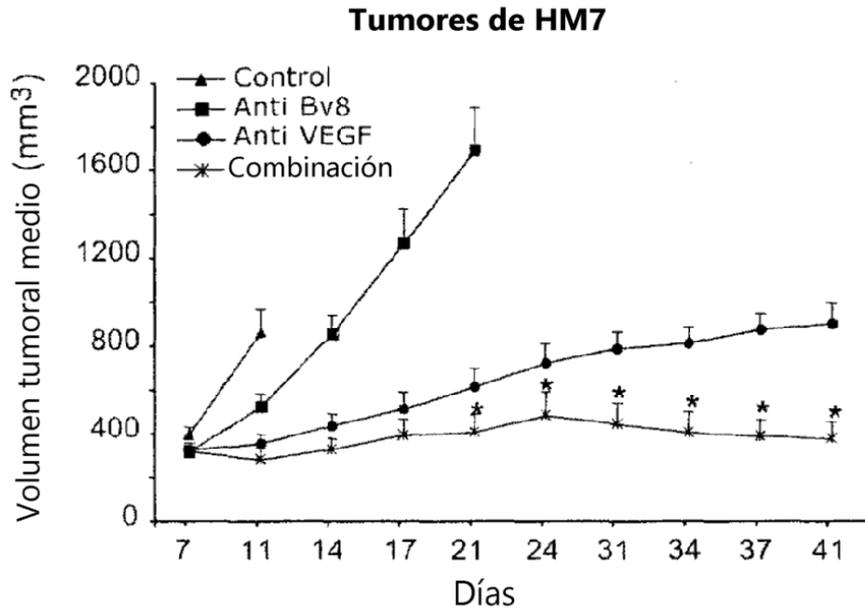


FIG. 6a

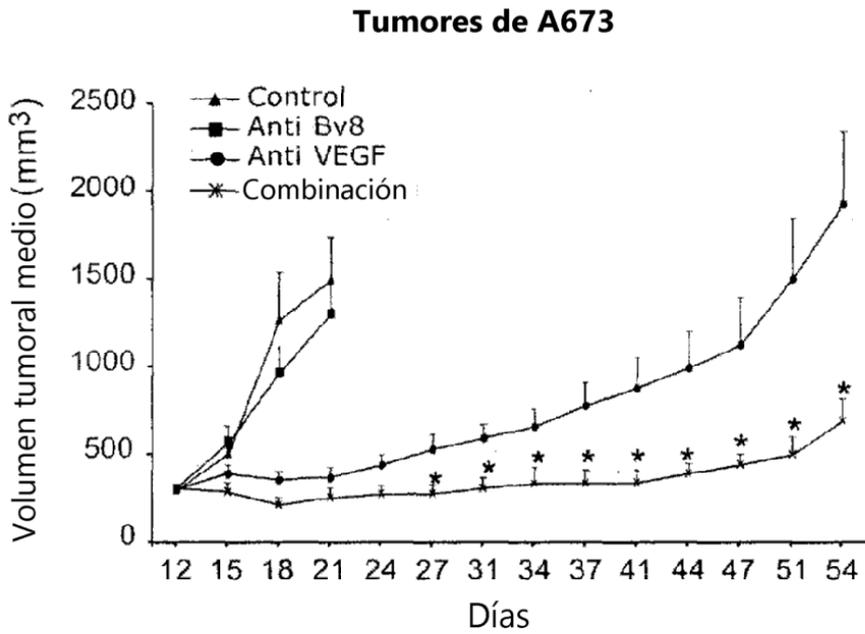


FIG. 6b

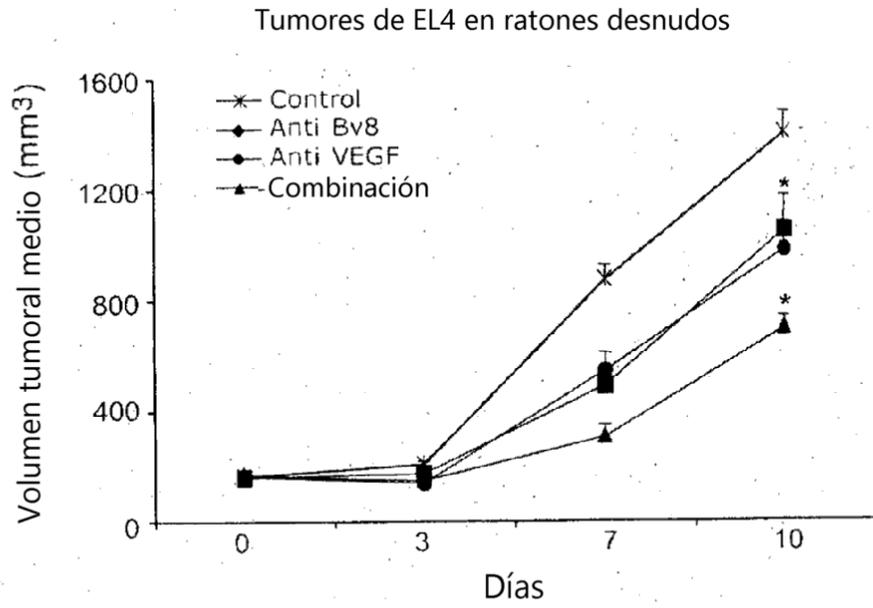


FIG. 6c

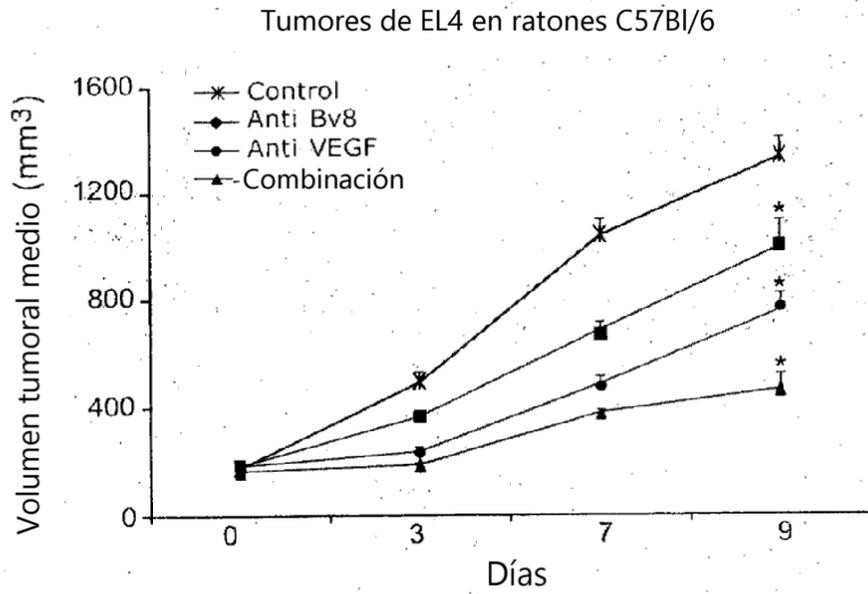


FIG. 6d

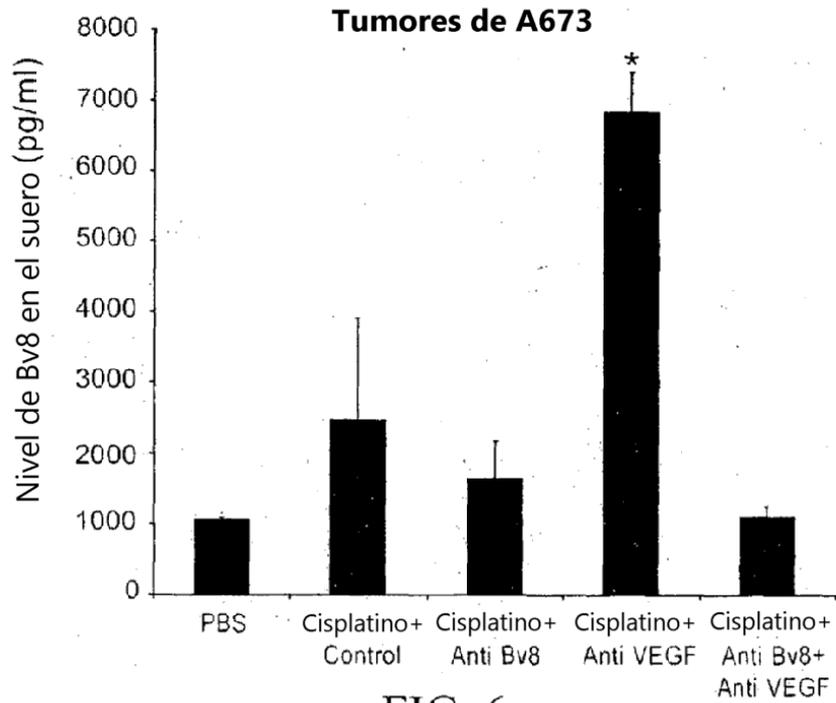


FIG. 6e

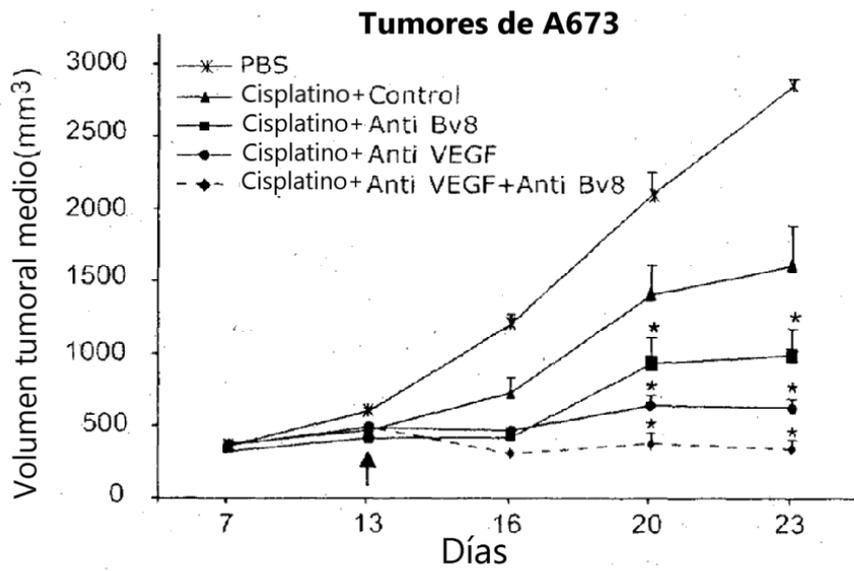


FIG. 6f

TGAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCC
GCTGCTGCTCACGCCCCGGCTGGGGACGCCGCCGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGA
CTCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGAT
TTGCACACCTATGGGCAAACTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAAACAATTT
TGGAAATGGAAGGCAGGAAAGAAGAAAGAGGAAGAGAAGCAAAAGGAAAAAGGAGGTTCC
ATTTTTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACG
GACTTCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCCCAAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCA
AATGTGA

FIG. 7

MRSLCCAPLLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACBKDSQCGGGMCCAVSIWVKSTRIC
PMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQERRKRKRSKRKRVPFFGERMHHTCPCLPGLACLRT
SENRFICLAQK

Características importantes de la proteína:

Secuencia señal:

1-21

Dominio transmembrana:

ninguno

Sitio de fosforilación de la proteína cinasa cAMP y cGMP dependiente:

87-90

Sitio de N-miristoilación:

41-46

42-47

43-48

Sitio de amidación:

99-102

FIG. 8

GAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCG
CTGCTGCTCAGCCCCGCGCTGGGGACGCCGCGGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGAC
TCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGATT
TGCACACCTATGGGCAAACCTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAGTTCCATTT
TTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGGCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACGGACT
TCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCCCAAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCAAATG
TGA

FIG. 9

MRSI¹CCAP²LLLLLLL³PL⁴LL⁵TF⁶FRAGDA⁷AVIT⁸GACDK⁹DSQ¹⁰CGGG¹¹MCCAV¹²SIW¹³VKS¹⁴IRICT¹⁵
PMGK¹⁶LGDS¹⁷CHPL¹⁸TRK¹⁹V²⁰PF²¹GR²²RM²³HT²⁴CP²⁵CL²⁶PGLA²⁷CL²⁸RT²⁹SF³⁰NR³¹FIC³²LA³³QK³⁴

Características importantes de la proteína:

Secuencia señal:

1-21

Dominio transmembrana:

ninguno

Sitio de N-miristoilación:

41-46

42-47

43-48

Sitio de amidación:

78-81

FIG. 10

MGDPRCAPELLLLLLLPLLETPPAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTP
MGQVGDSCHEPLTRKVPFWGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

Características importantes de la proteína:

Secuencia señal:

1-20

Dominio transmembrana:

ninguno

Sitio de N-miristoilación:

40-45

41-46

42-47

Sitio de amidación:

77-80

FIG. 12

M R S L C C A P L L L L L L L L P L L L T P R A G D A A V I T G A C D K D S Q C G G G M C C A V S I 50 ser humano

M G D P R C A P L L L L L L L L P L L E T P R A G D A A V I T G A C D K D S Q C G G G M C C A V S I 50 ratón

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

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

R R M H H T C P C L P G L A C L R T S F N R F I C L A Q K

R R M H H T C P C L P G L A C L R T S F N R F I C L A R K

FIG. 13

Células de médula ósea

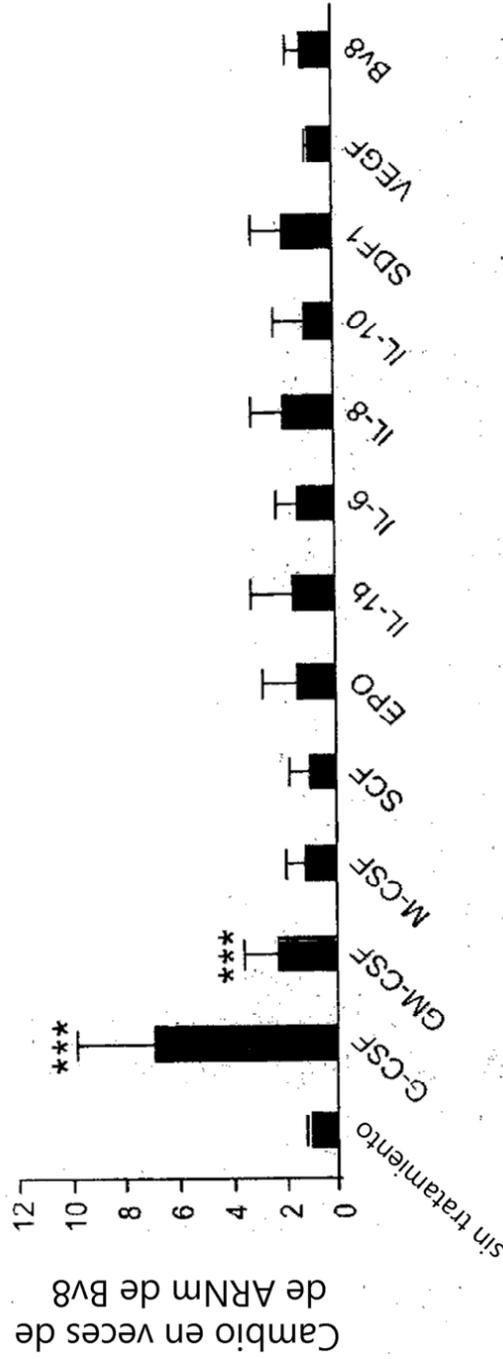


FIG. 14a

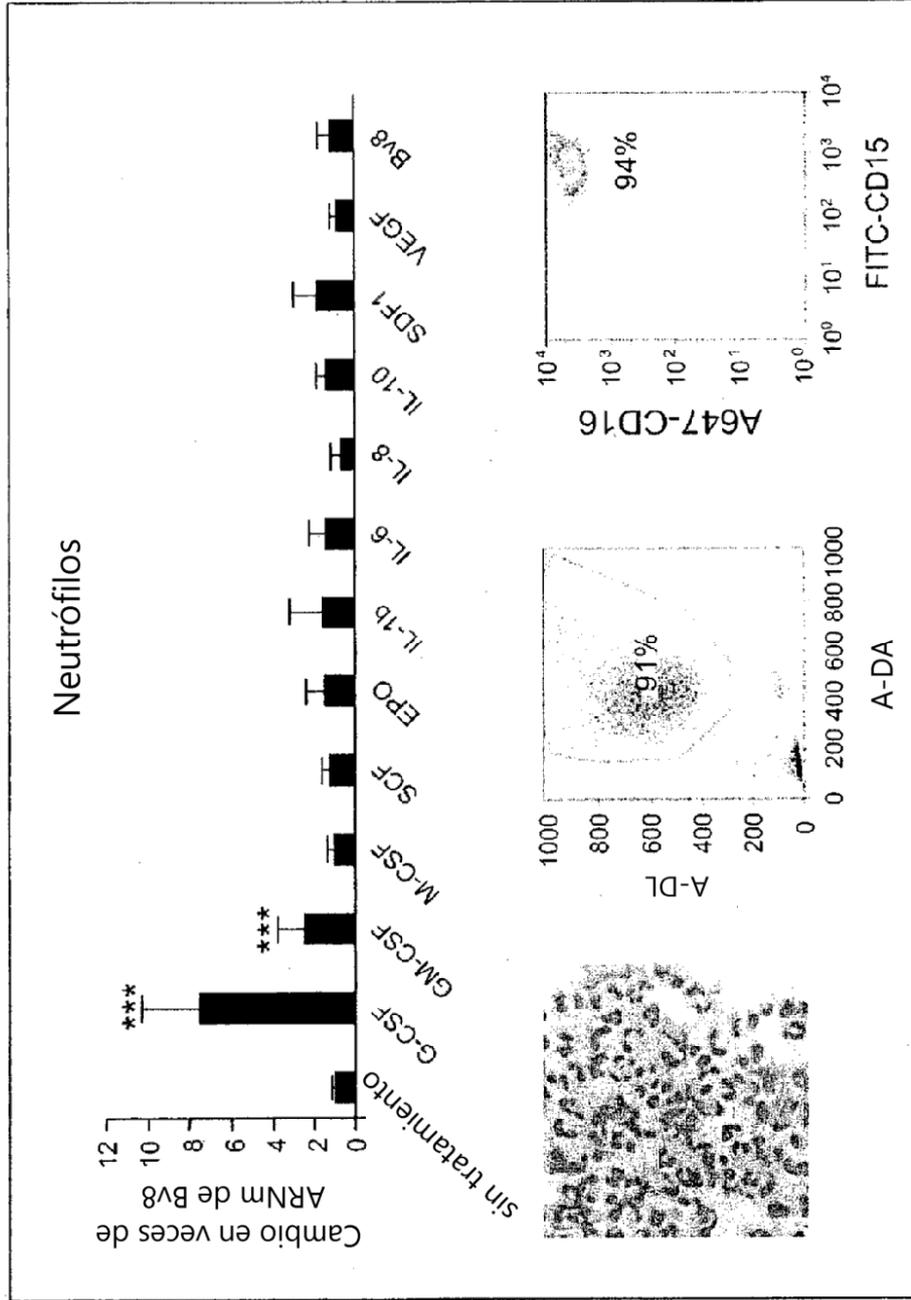


FIG. 14b

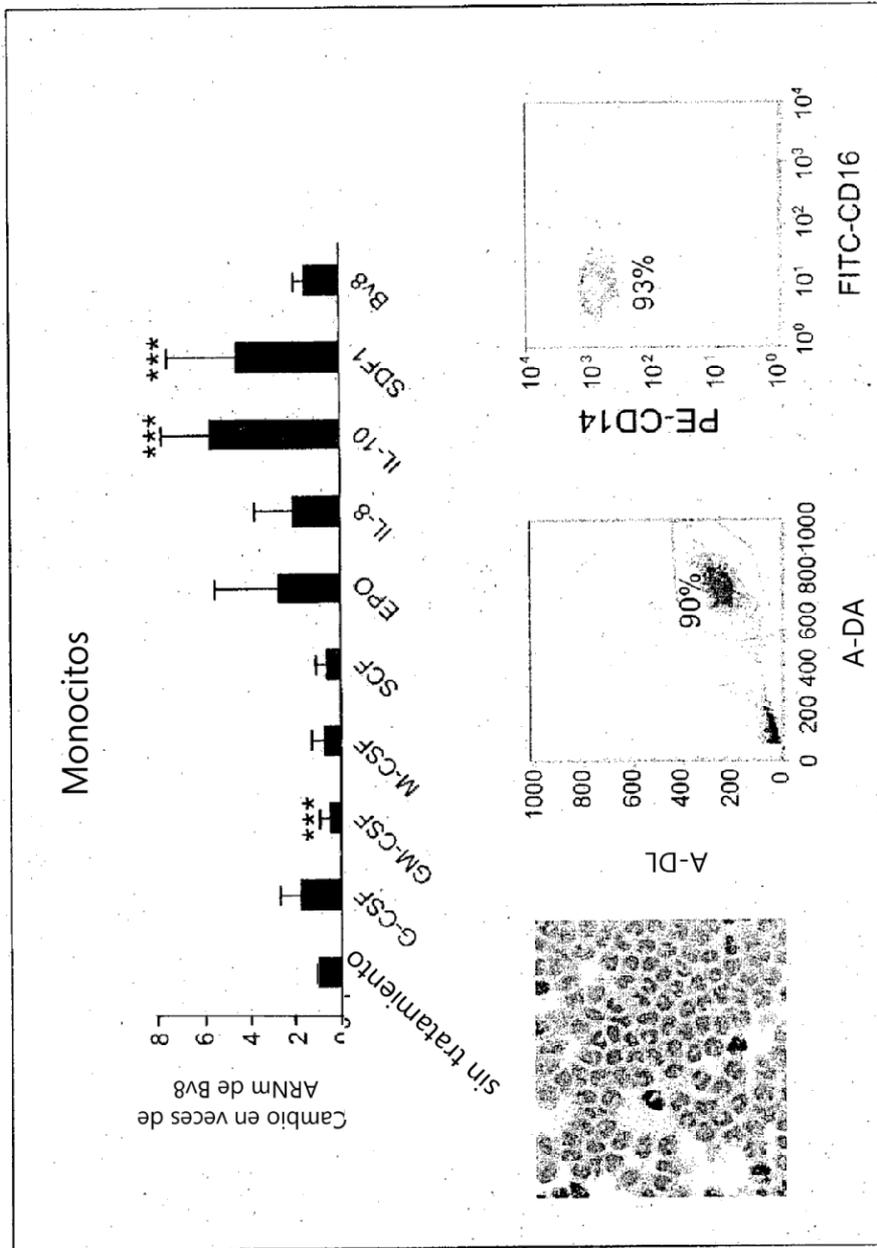


FIG. 14c

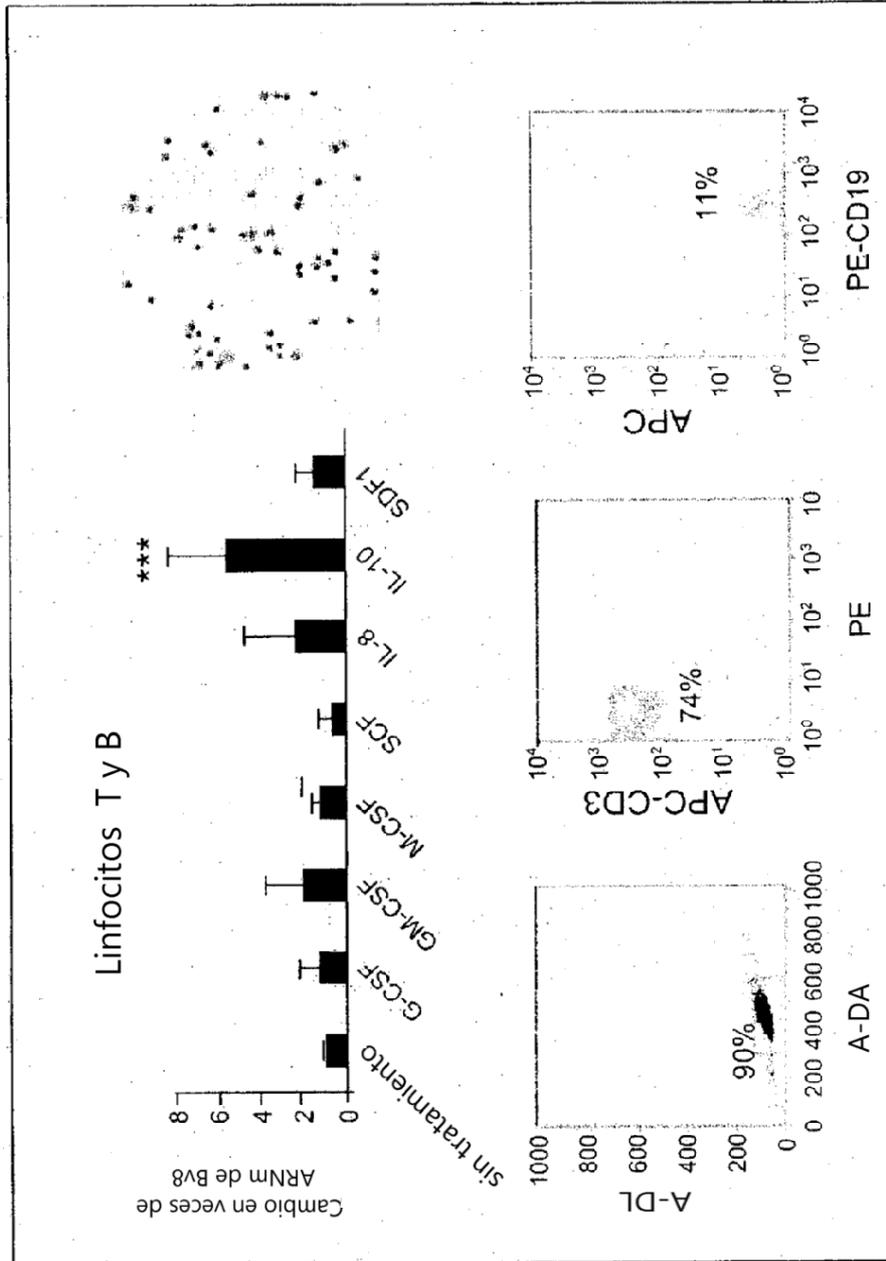


FIG. 14d

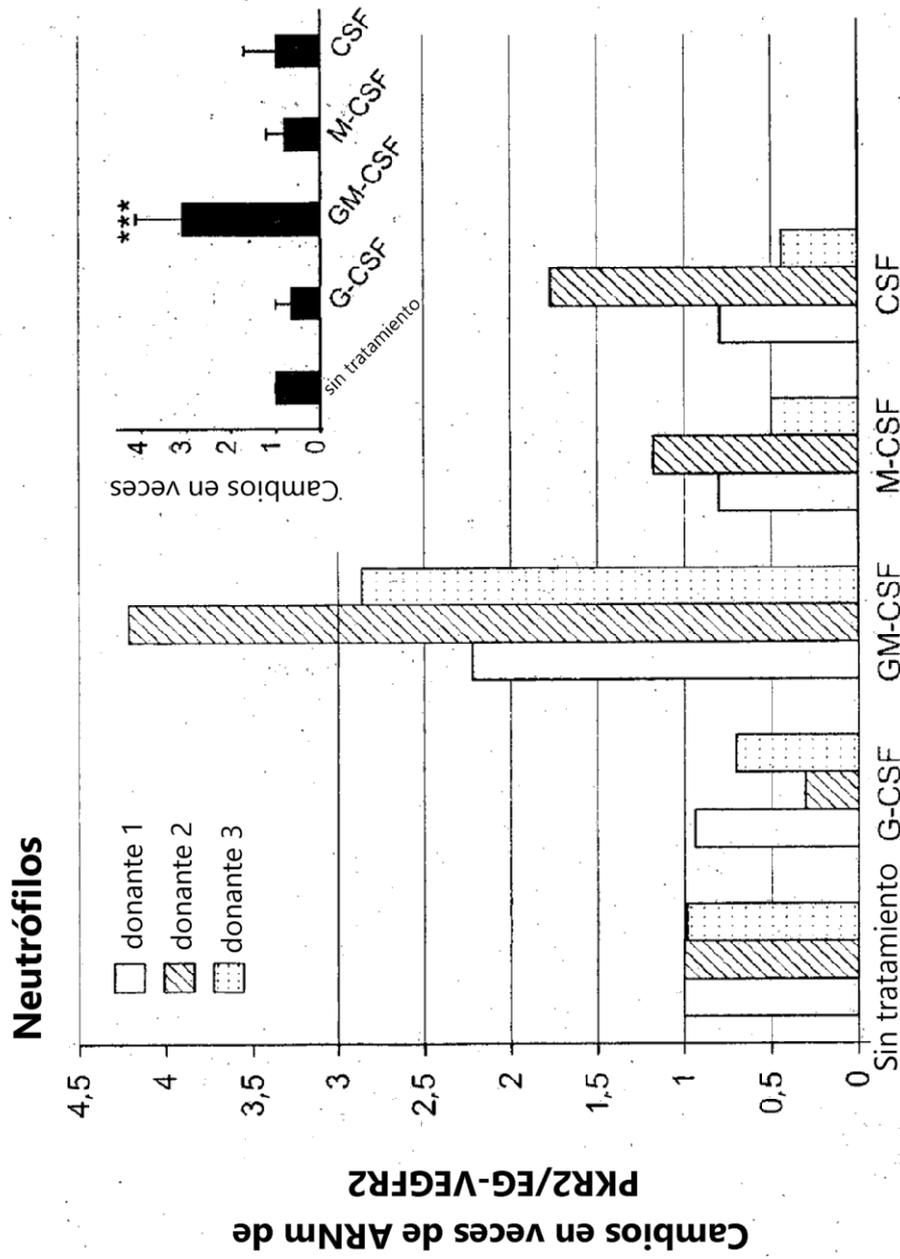


FIG. 15a

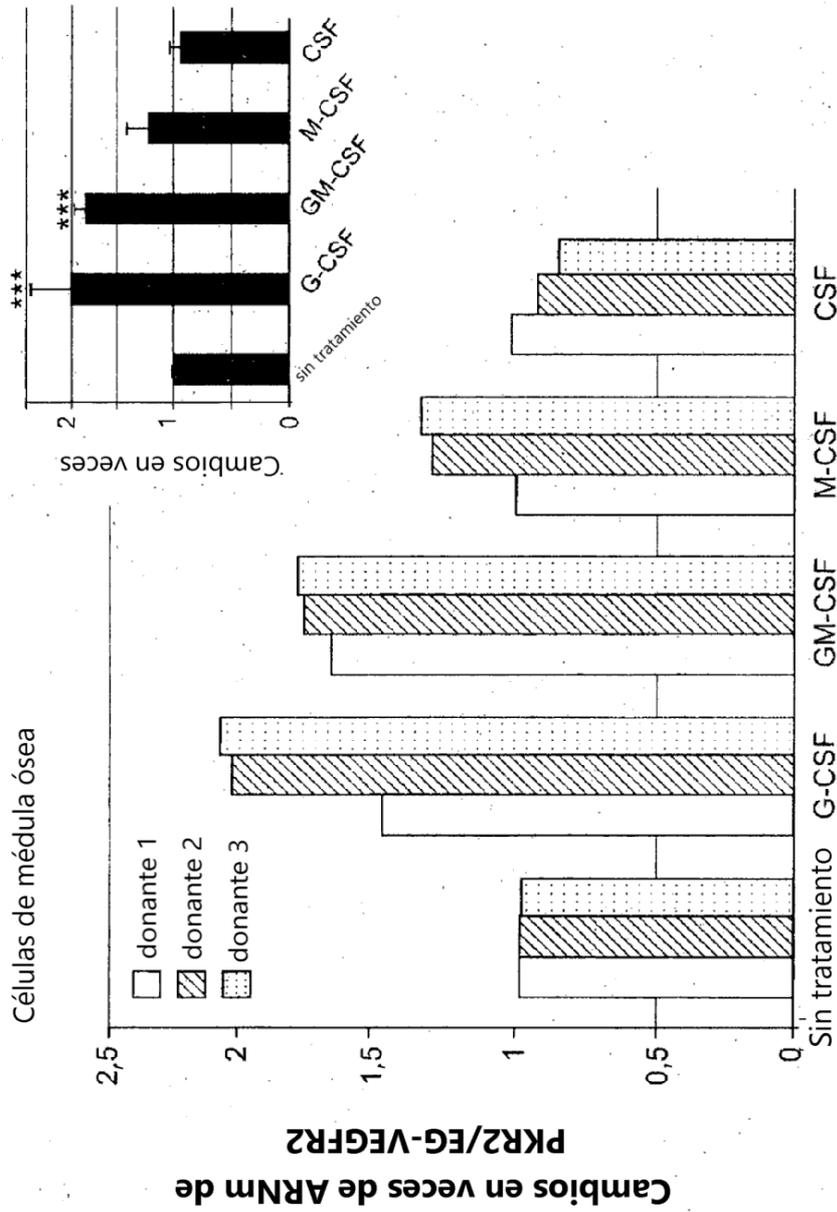


FIG. 15b

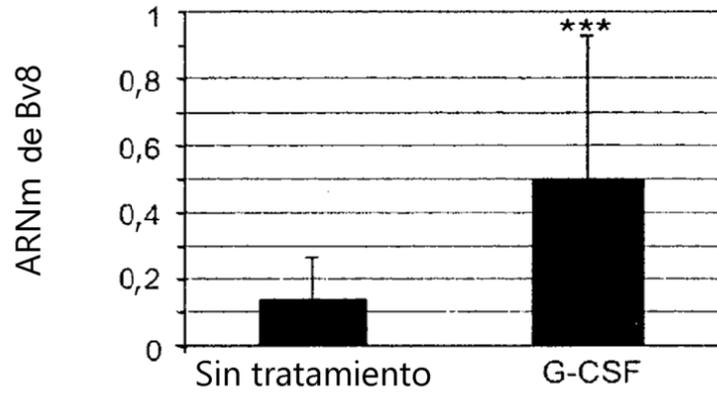


FIG. 16a

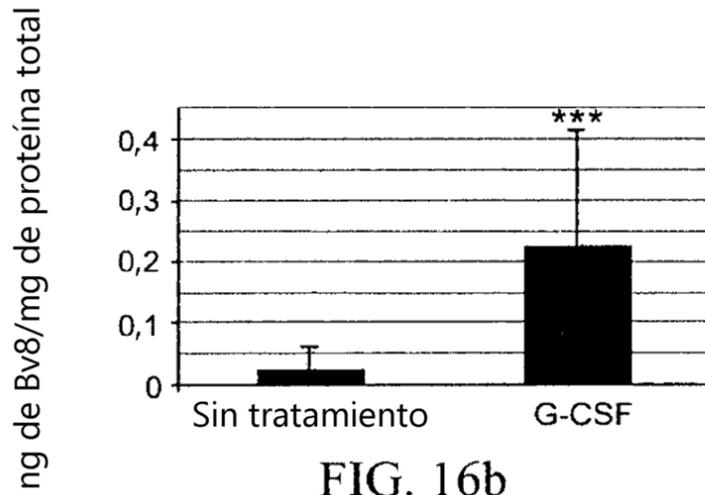


FIG. 16b

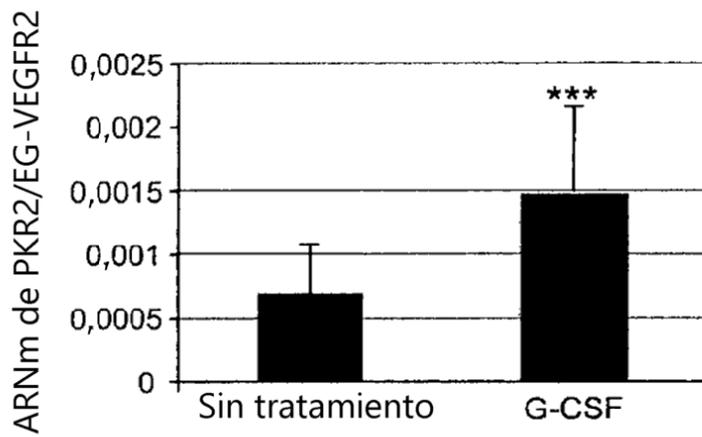
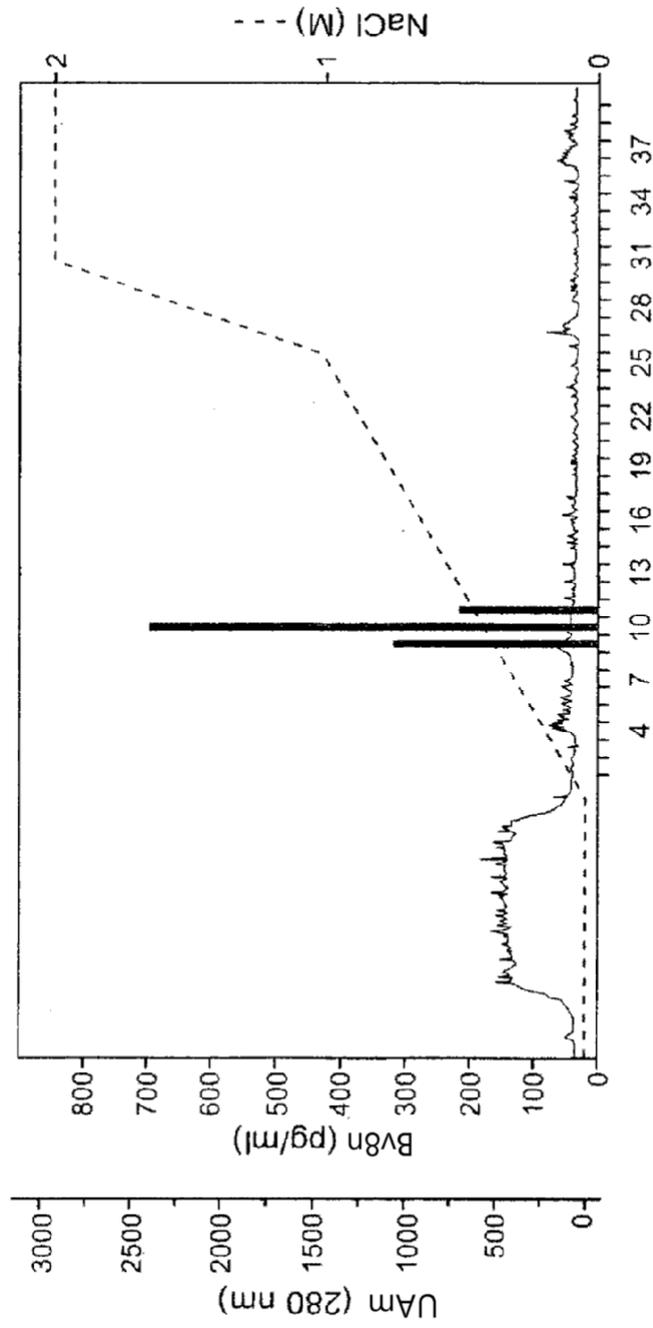


FIG. 16c



Fracciones de la columna de heparina

FIG. 17a

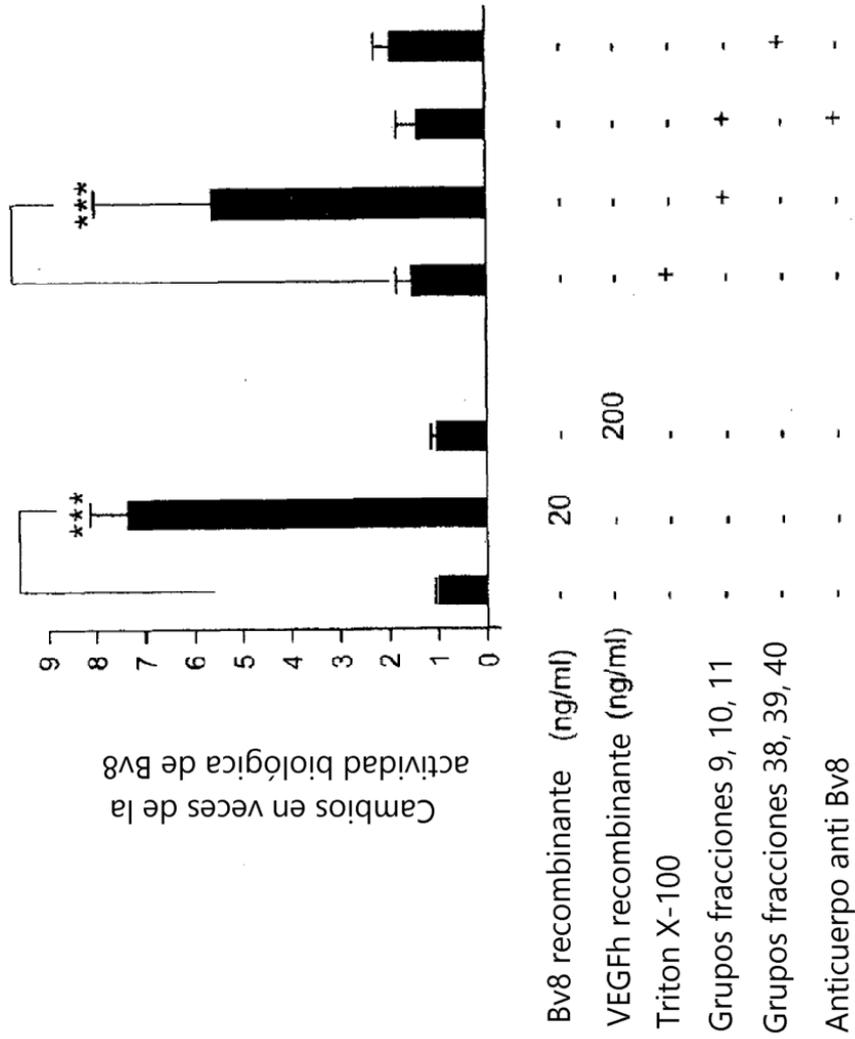


FIG. 17b

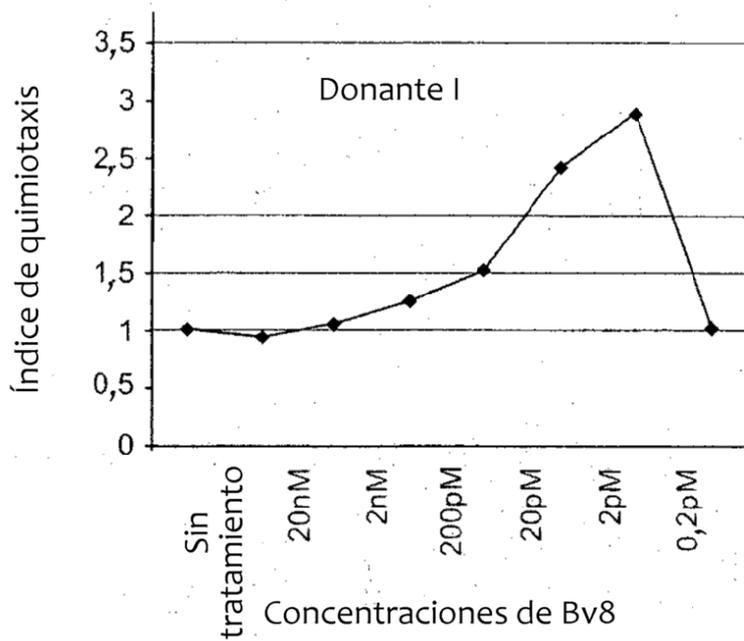


FIG. 18a

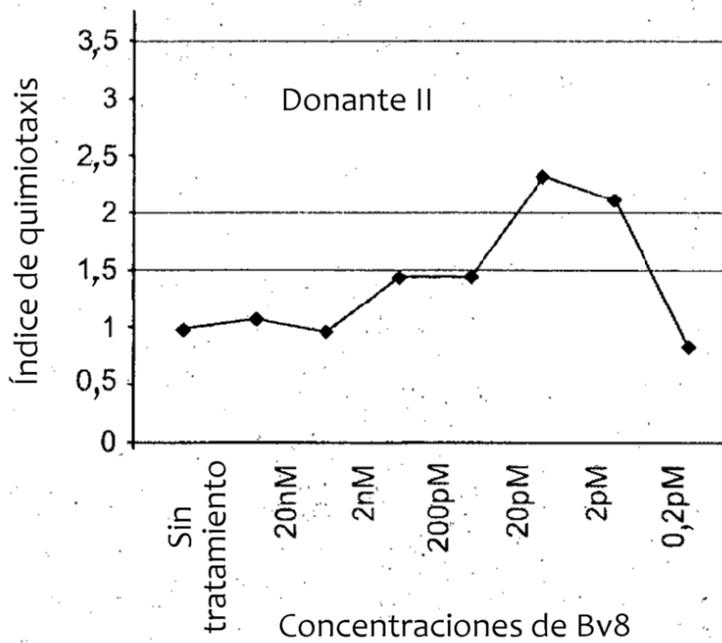


FIG. 18b

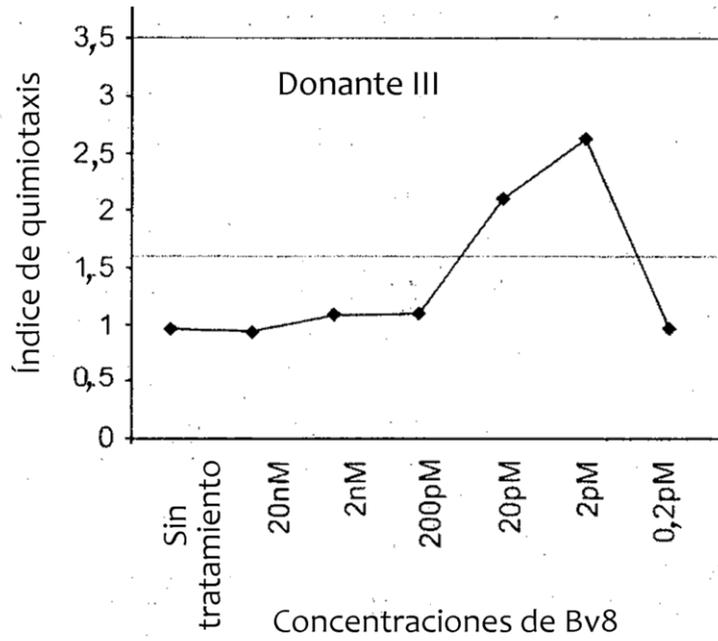


FIG. 18c

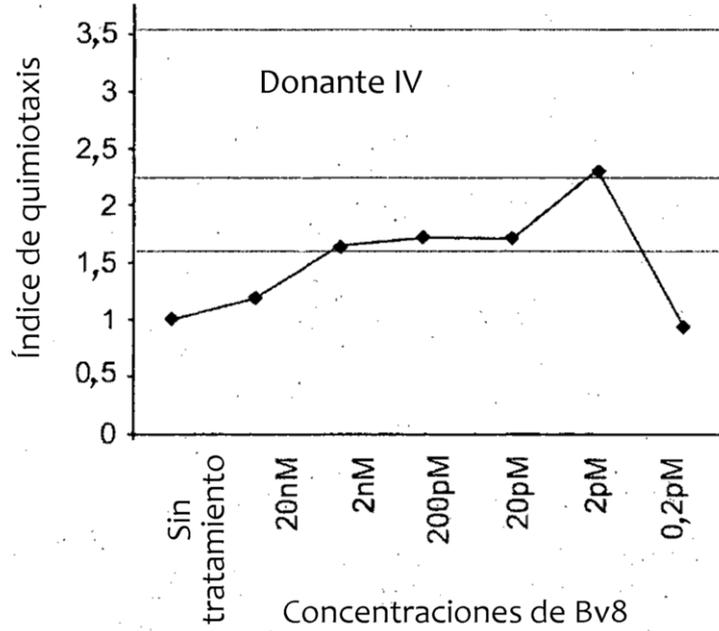


FIG. 18d

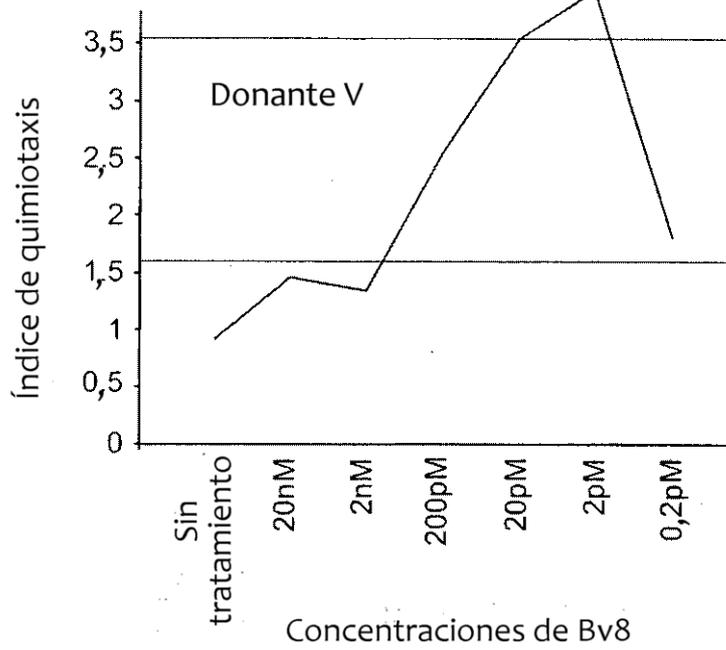


FIG. 18e

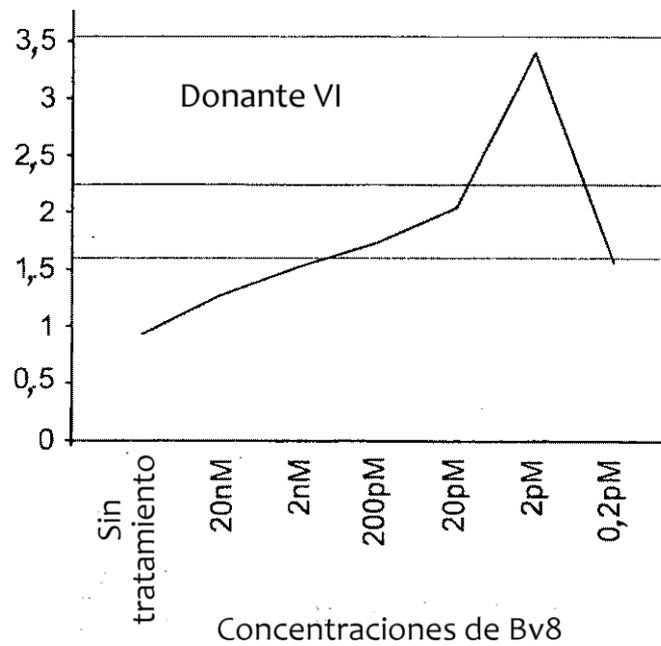


FIG. 18f

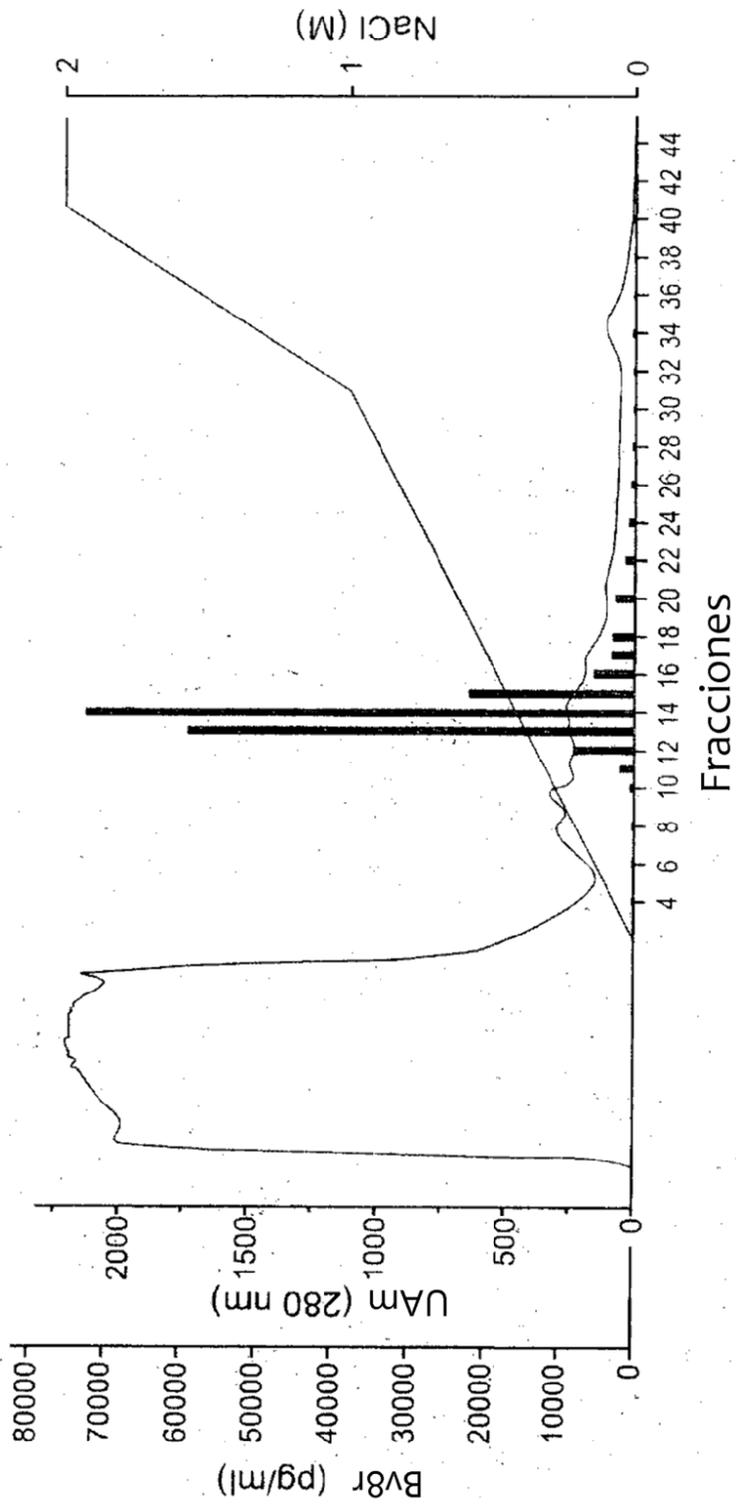


FIG. complementaria 1a

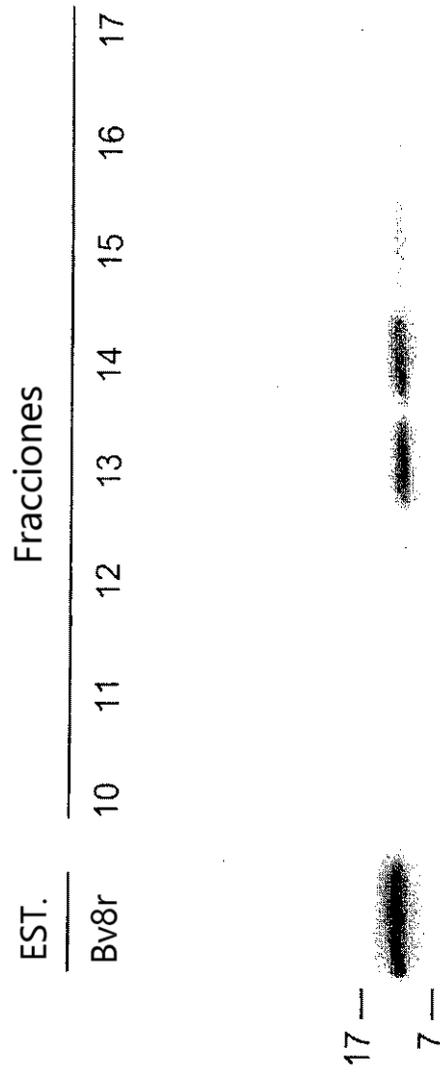


FIG. complementaria 1b

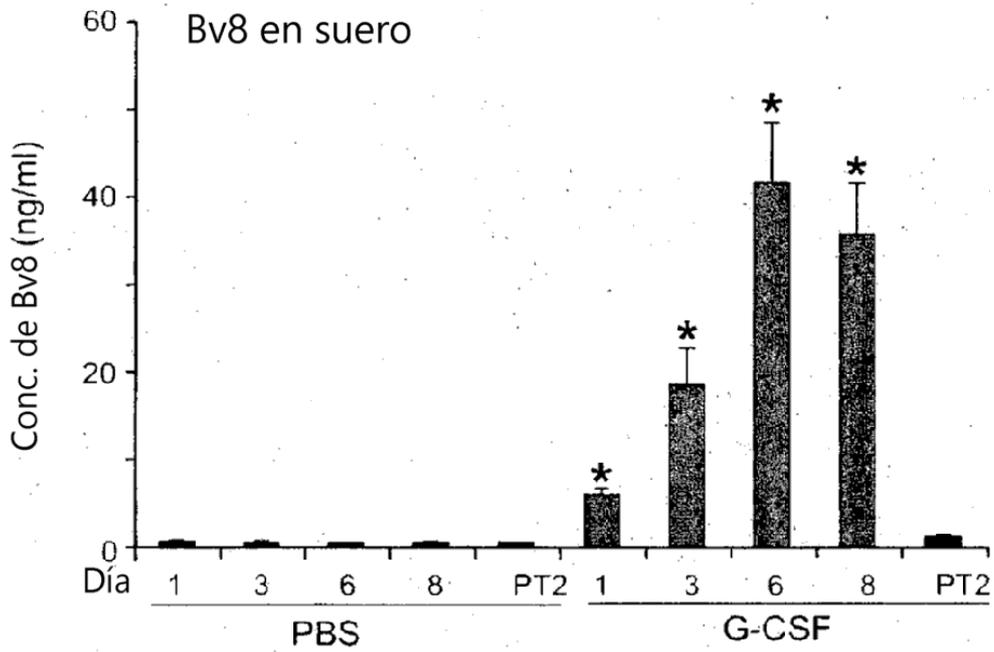


FIG. complementaria 2a

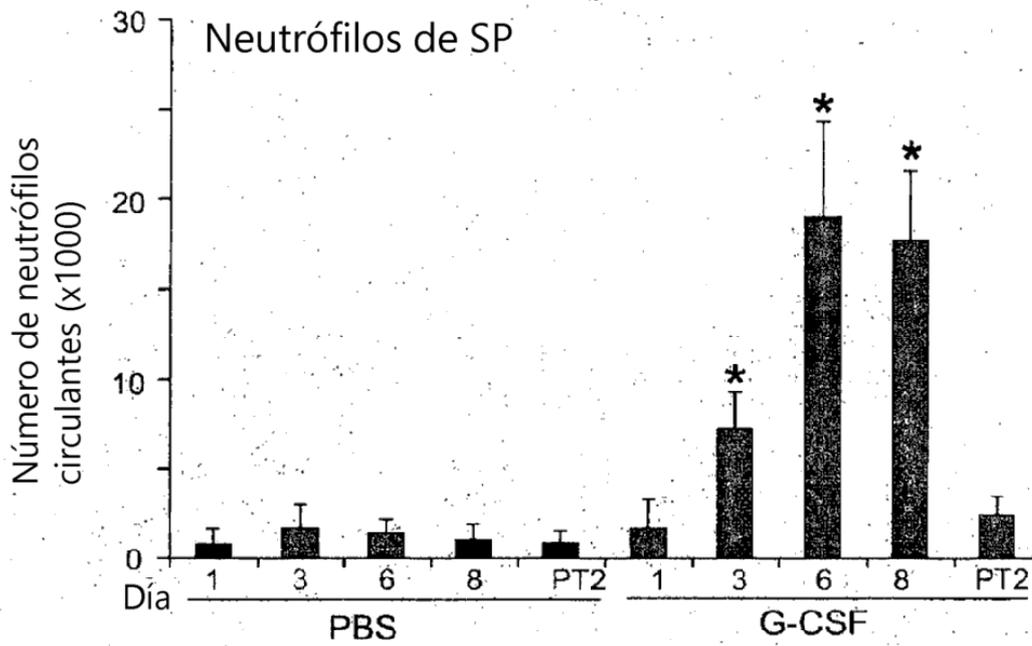


FIG. complementaria 2b

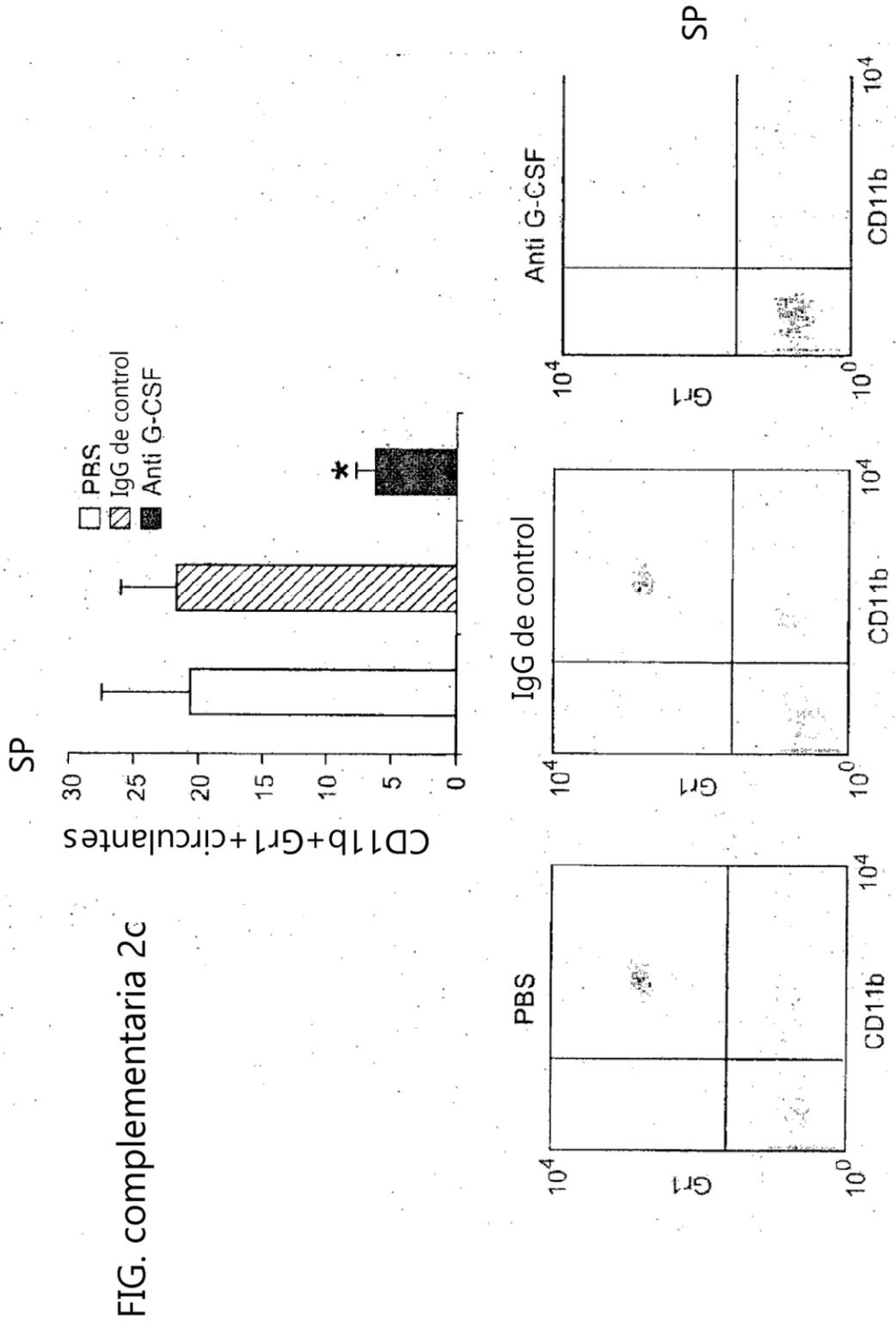


FIG. complementaria 2c

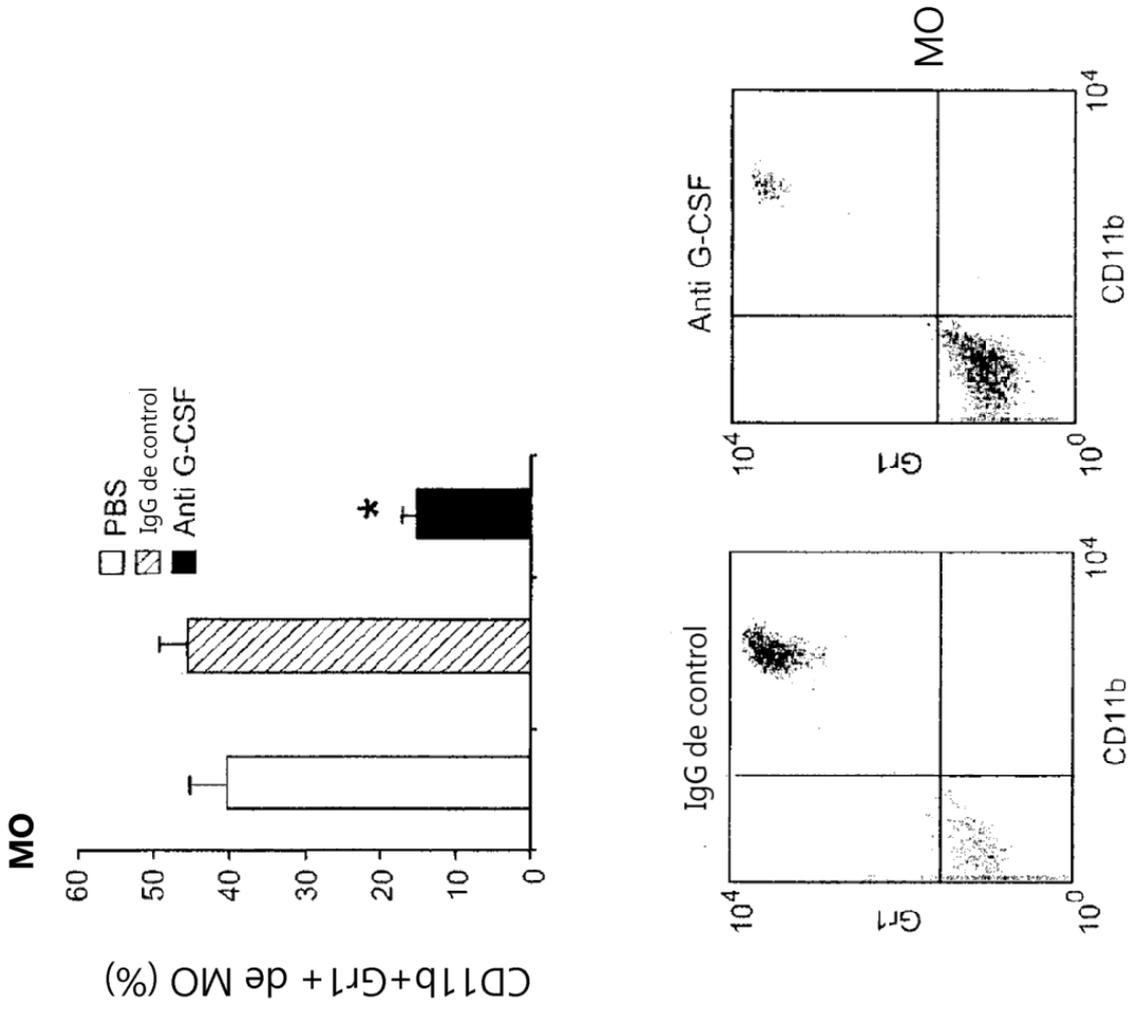


FIG. complementaria 2d

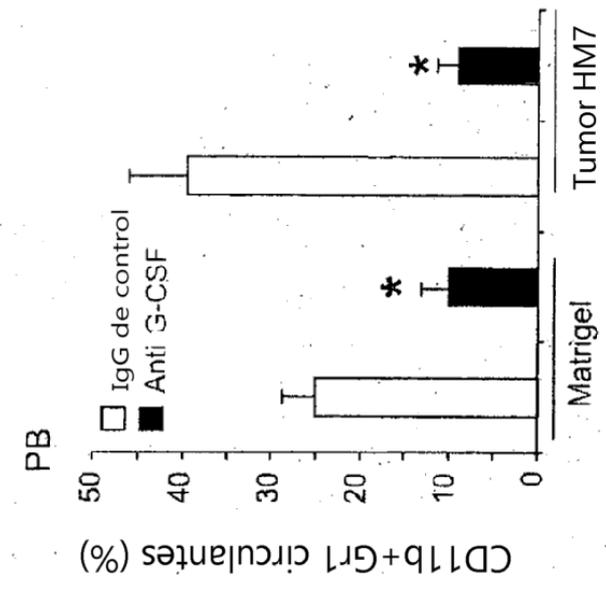
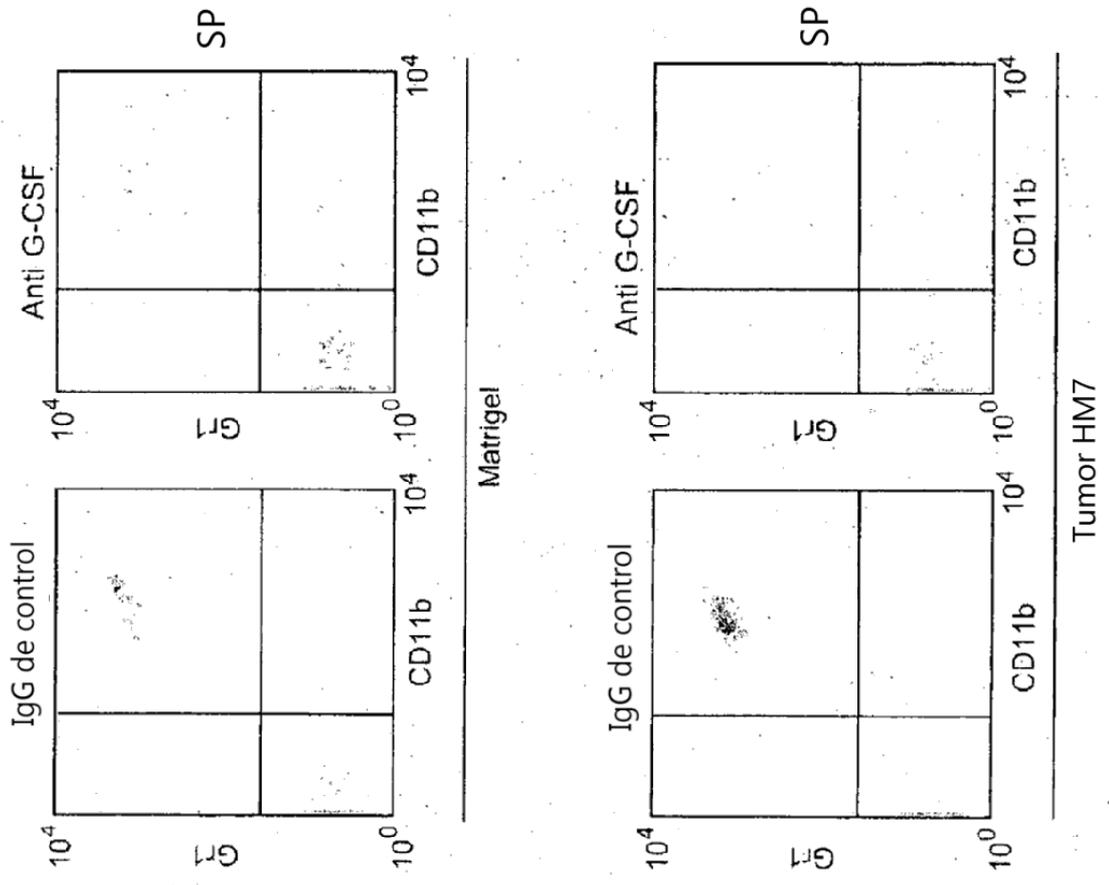


FIG. complementaria 2e

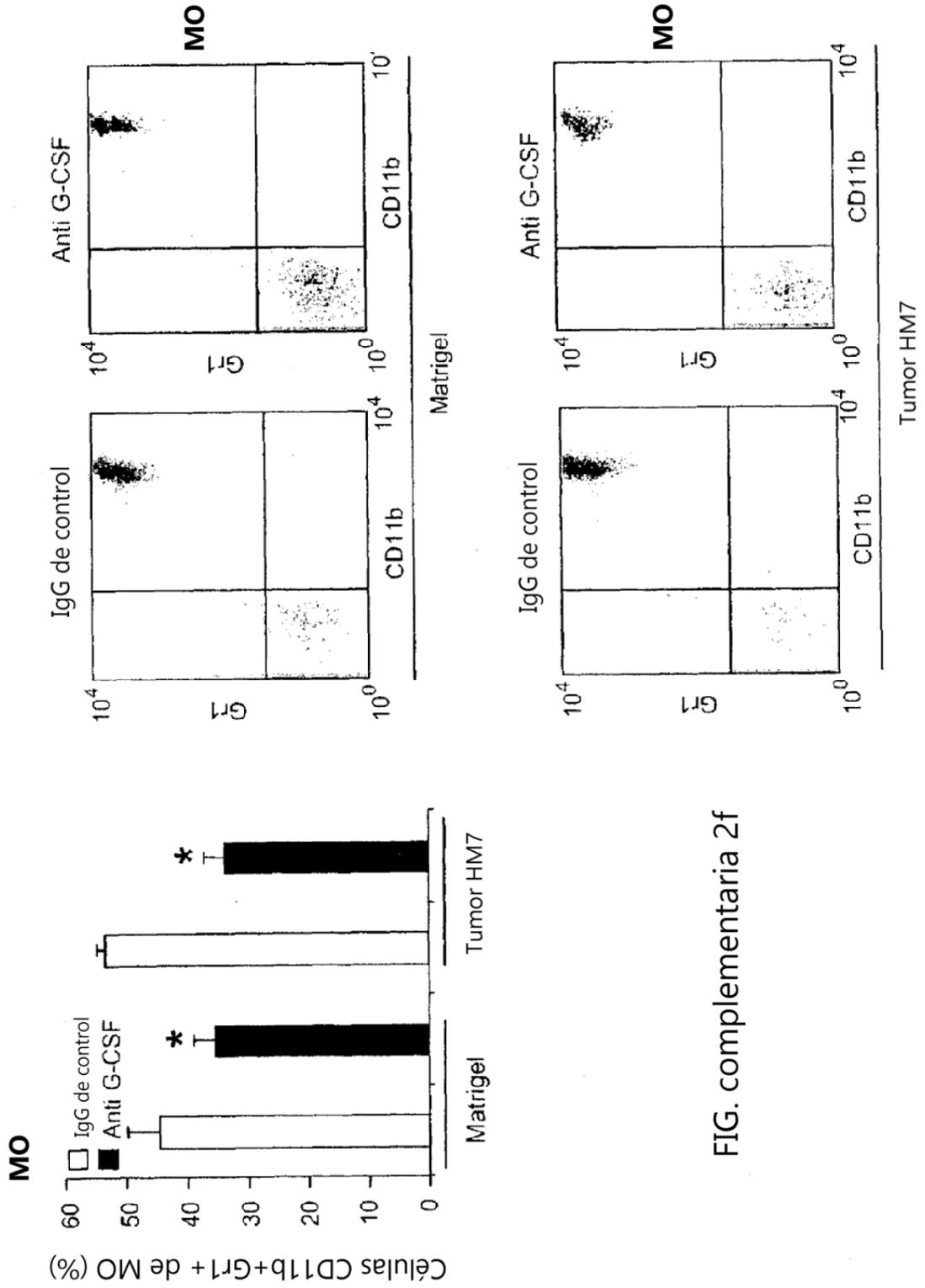


FIG. complementaria 2f

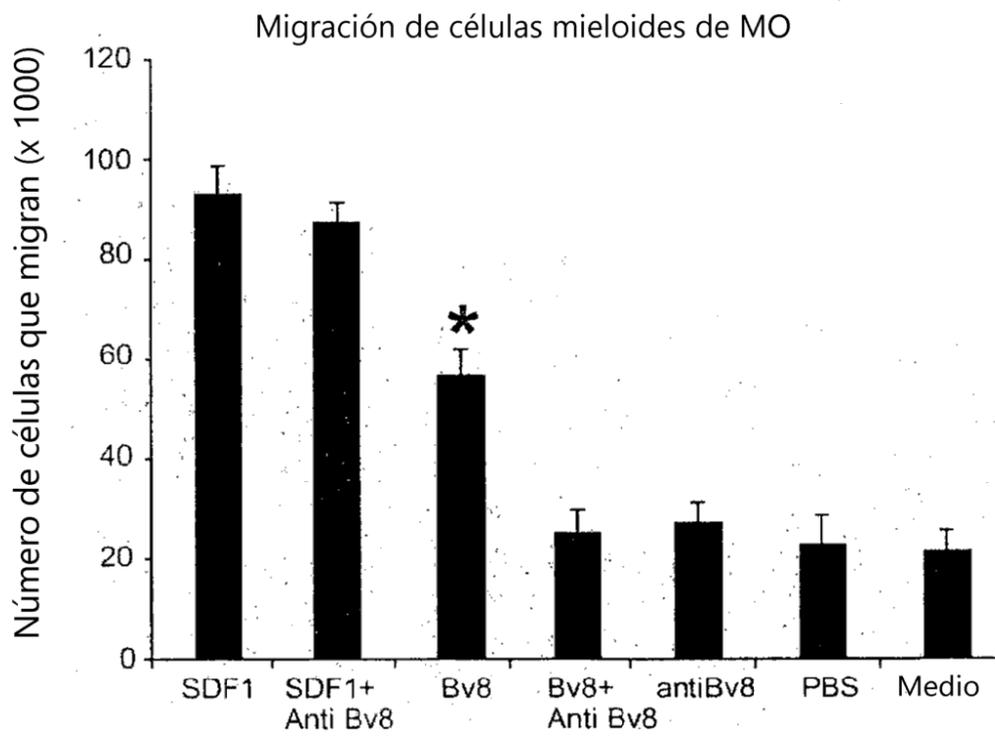


FIG. complementaria 3a

Expresión de EV-VEGFR1 en células mieloides de MO

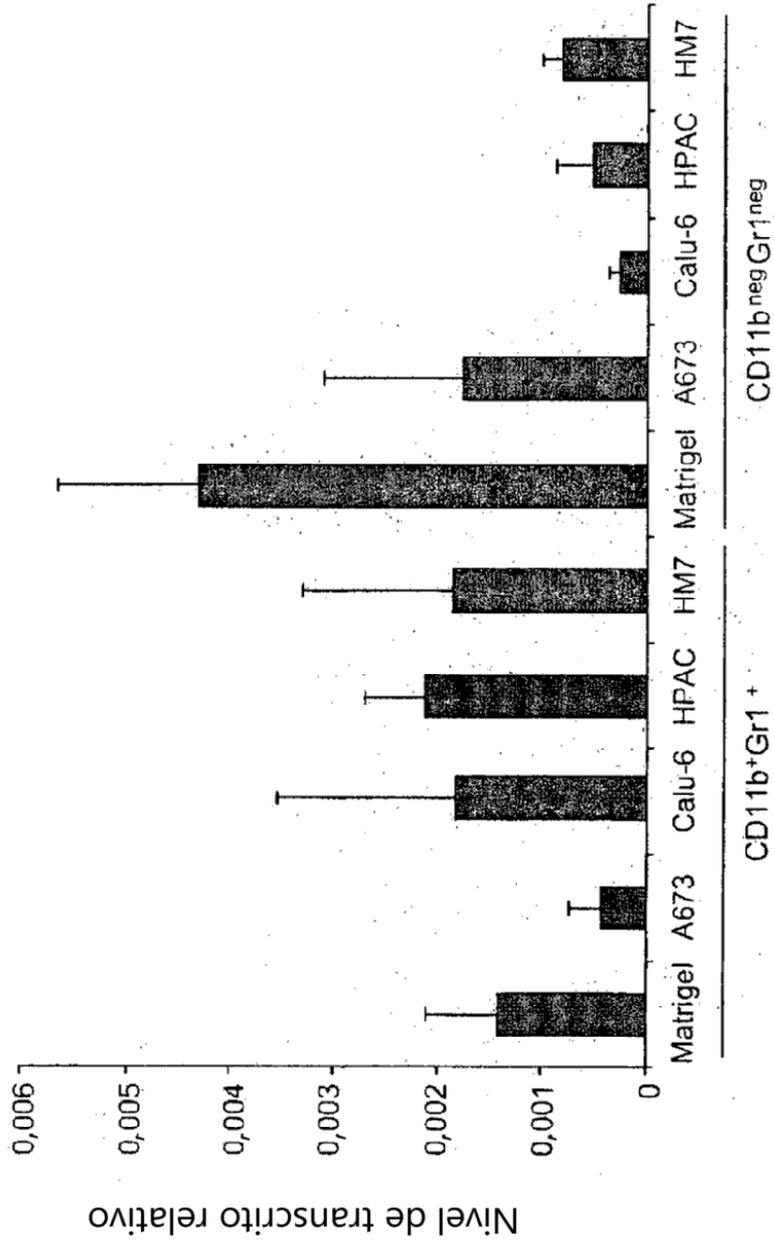


FIG. complementaria 3b

Expresión de EG-VEGFR2 en células mieloides de MO

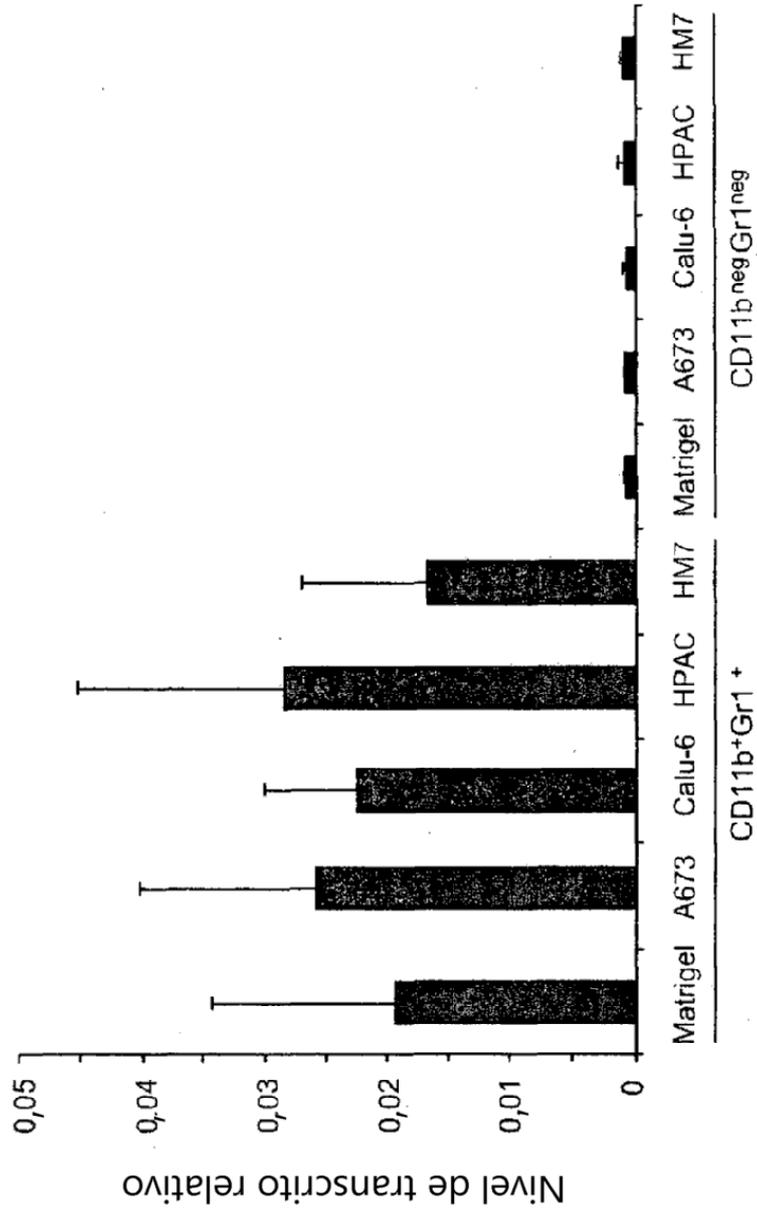


FIG. complementaria 3c

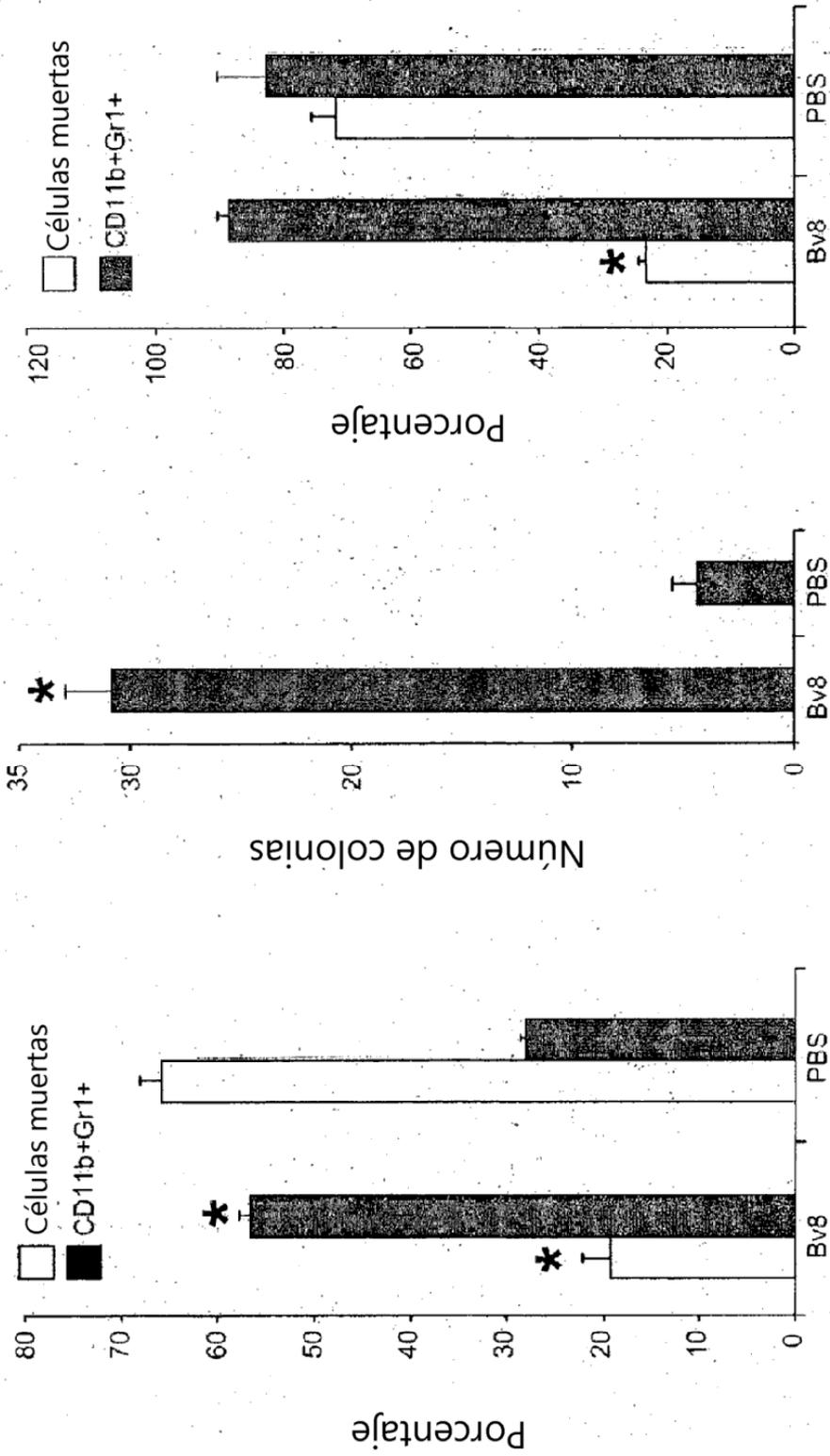


FIG. complementaria 3f

FIG. complementaria 3e

FIG. complementaria 3d

Tratamiento interrumpido de A673 con anti Bv8

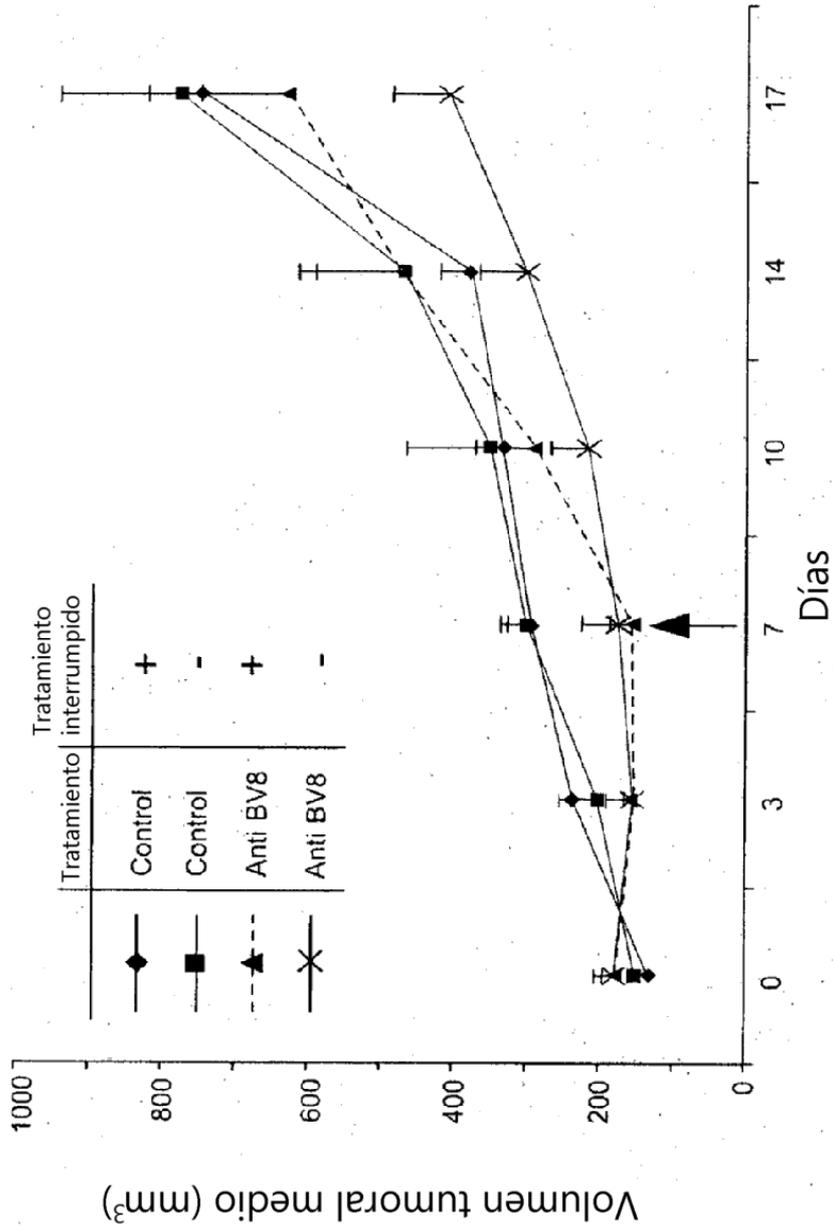


FIG. complementaria 3g

Tratamiento interrumpido de HM7 con anti Bv8

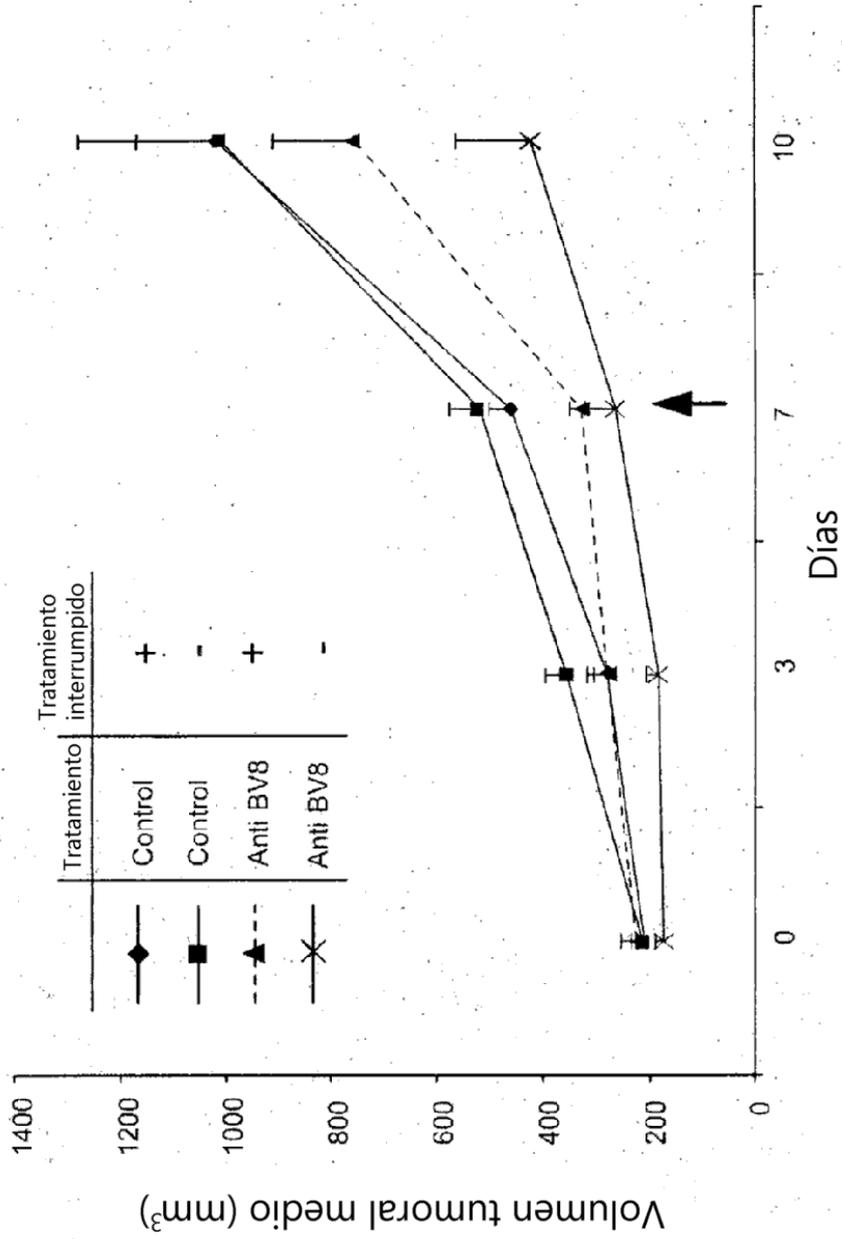


FIG. complementaria 3h

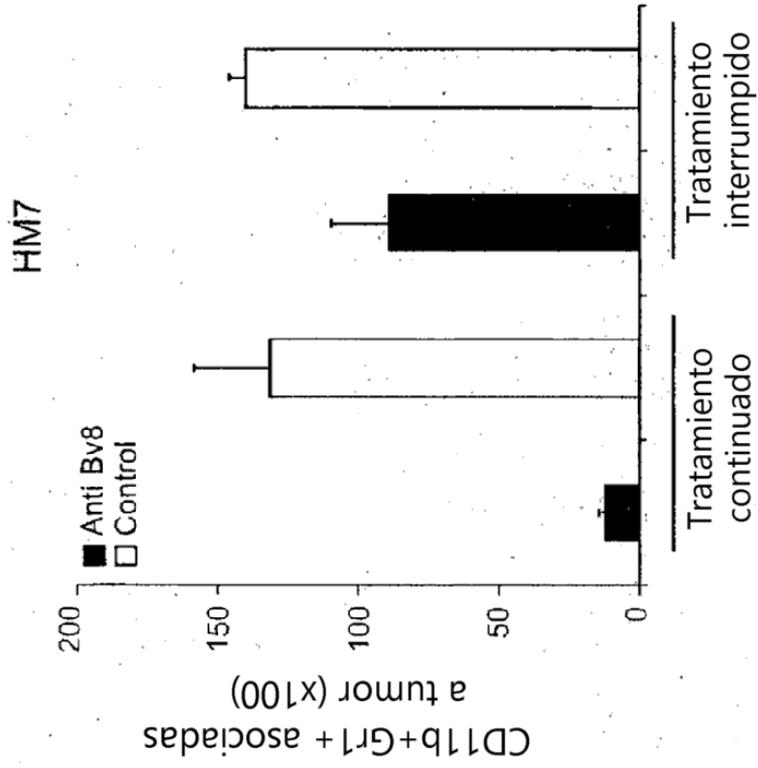


FIG. complementaria 3j

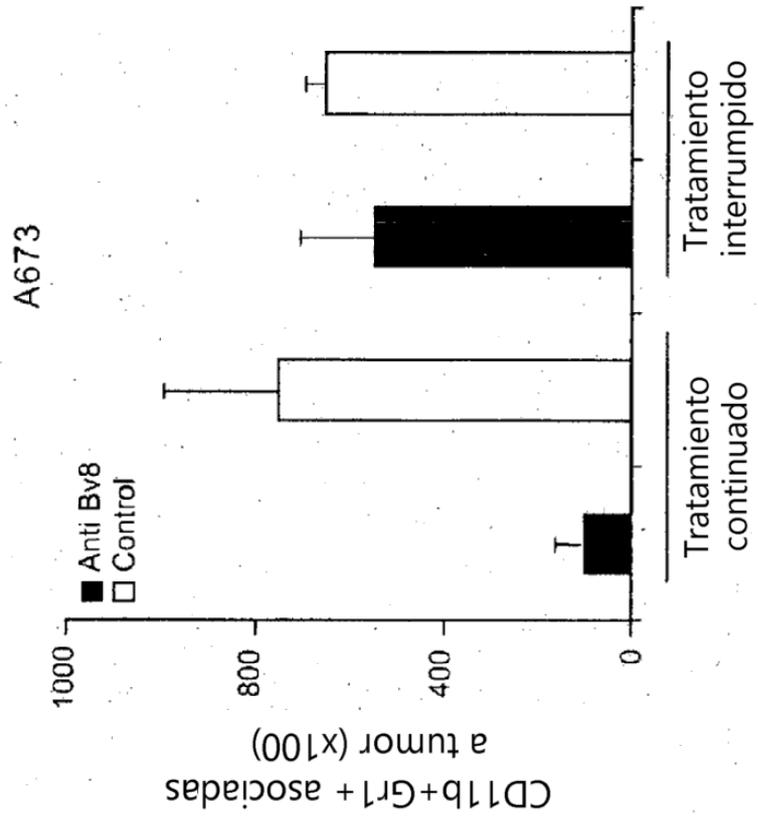


FIG. complementaria 3i

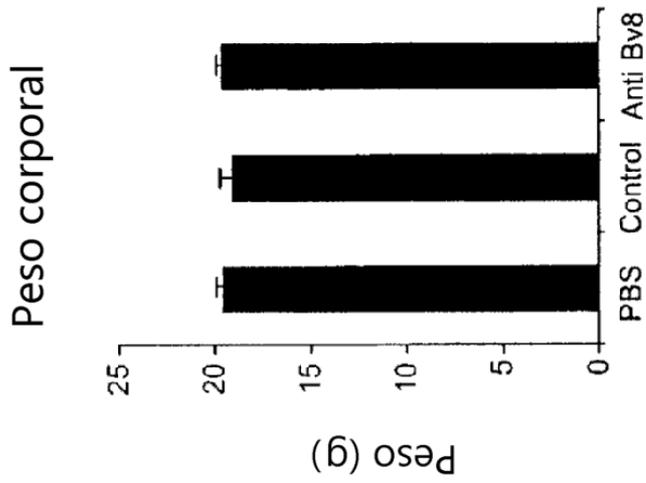
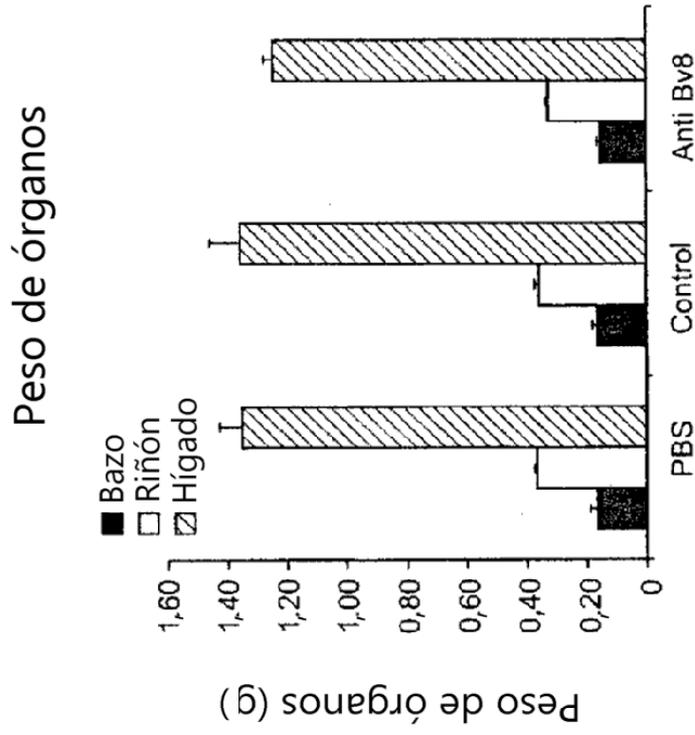


FIG. complementaria 4a

FIG. complementaria 4b

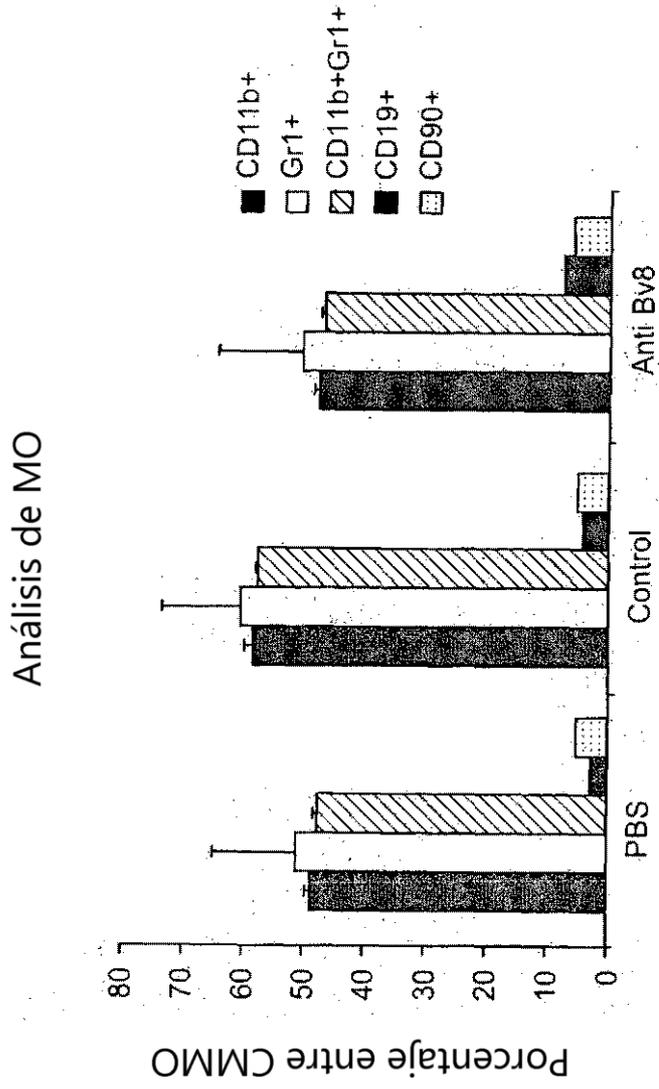


FIG. complementaria 4c

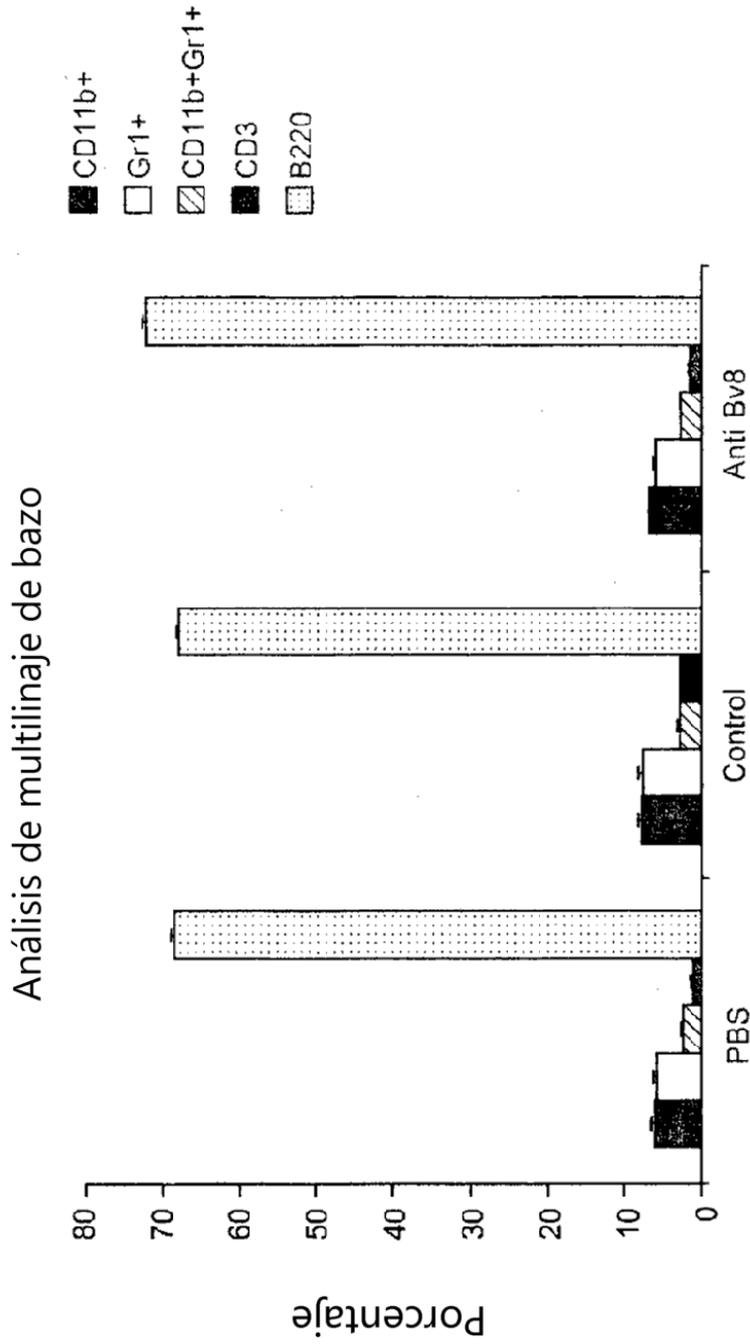


FIG. complementaria 4d

Análisis de multilinaje de SP

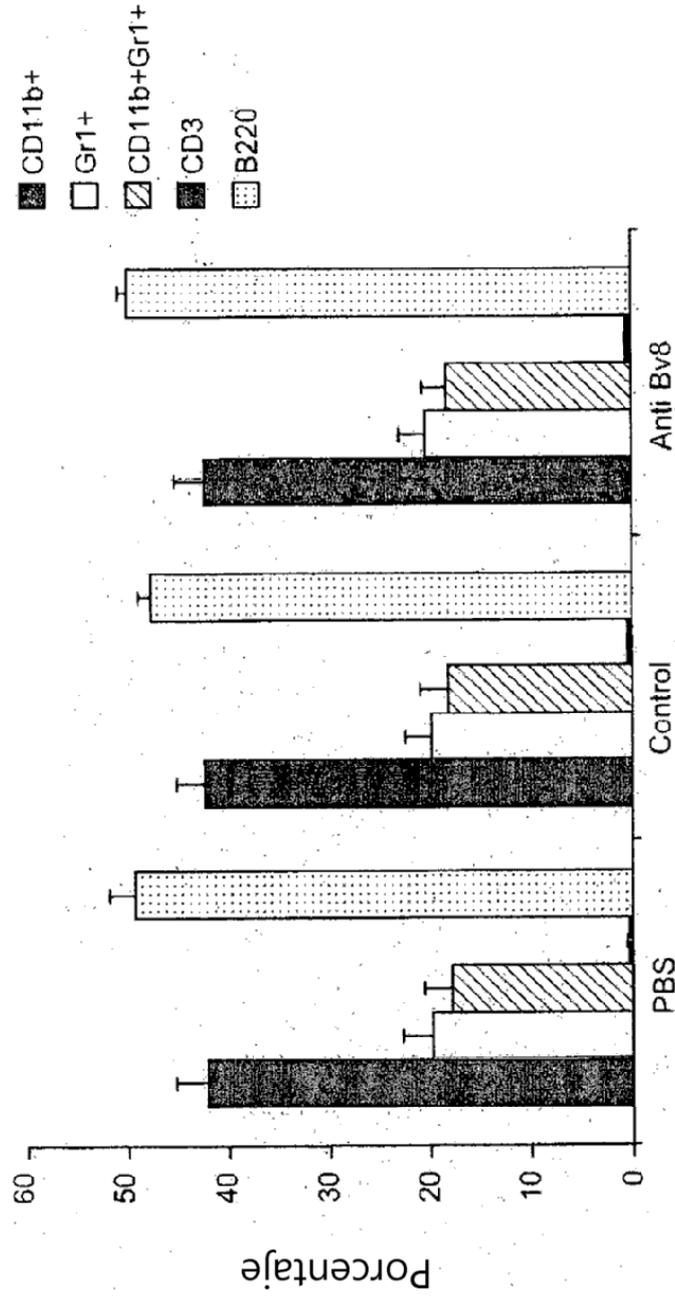


FIG. complementaria 4e

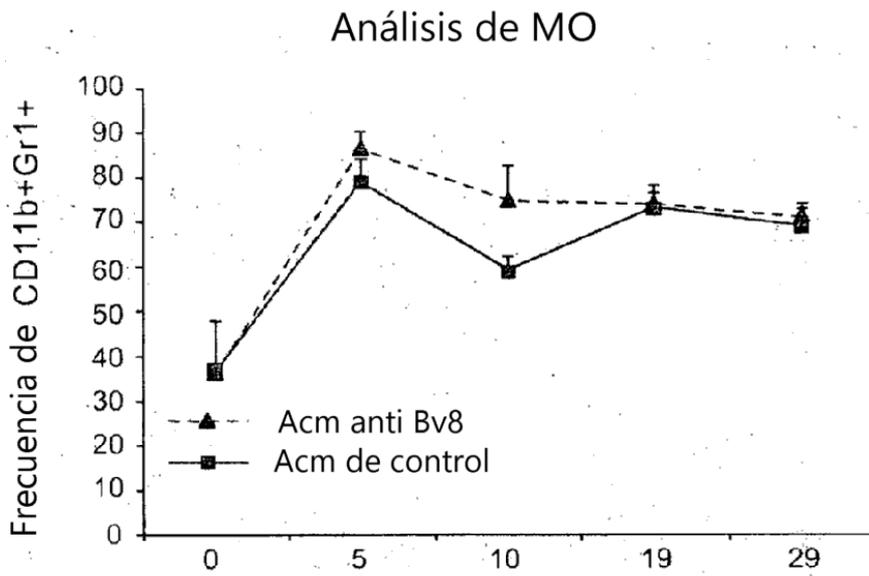


FIG. complementaria 5a

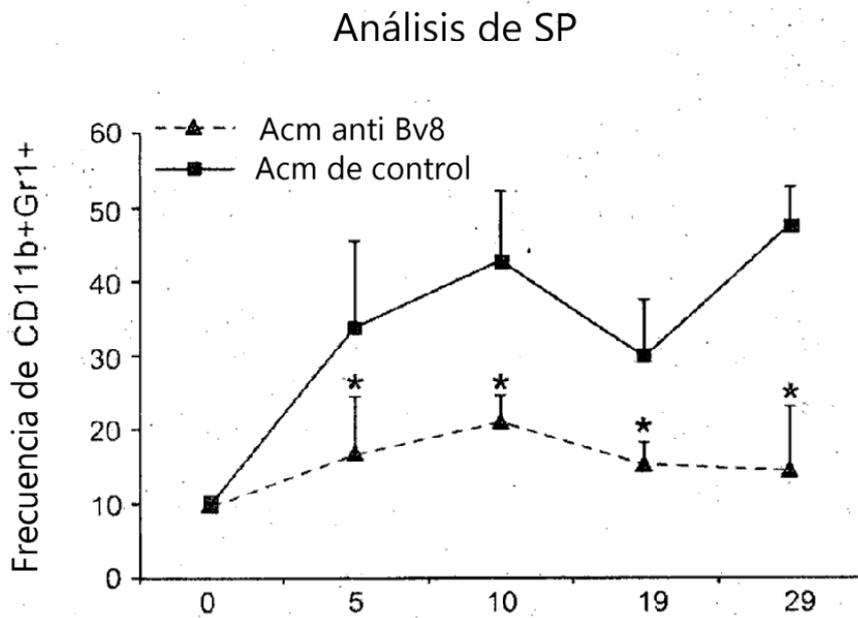


FIG. complementaria 5b

Análisis de tumor

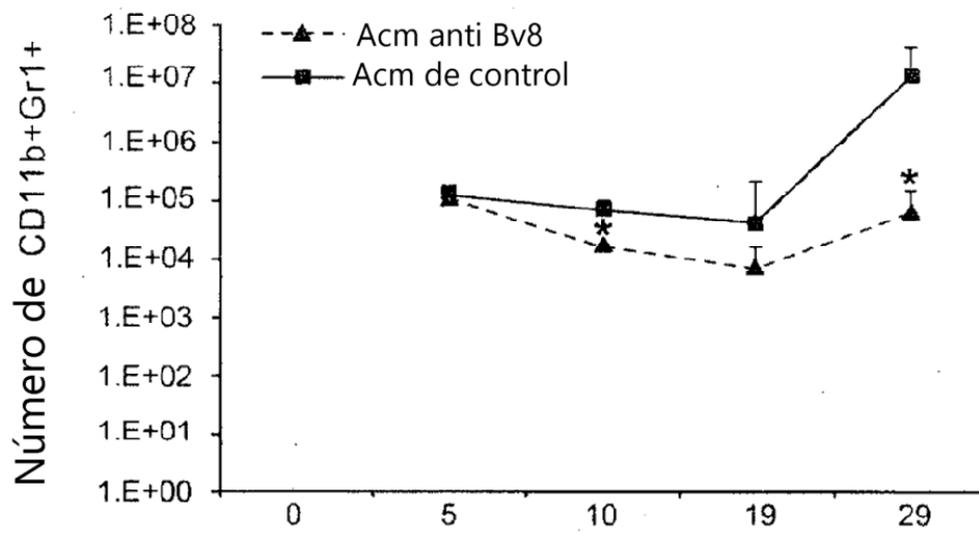


FIG. complementaria 5c

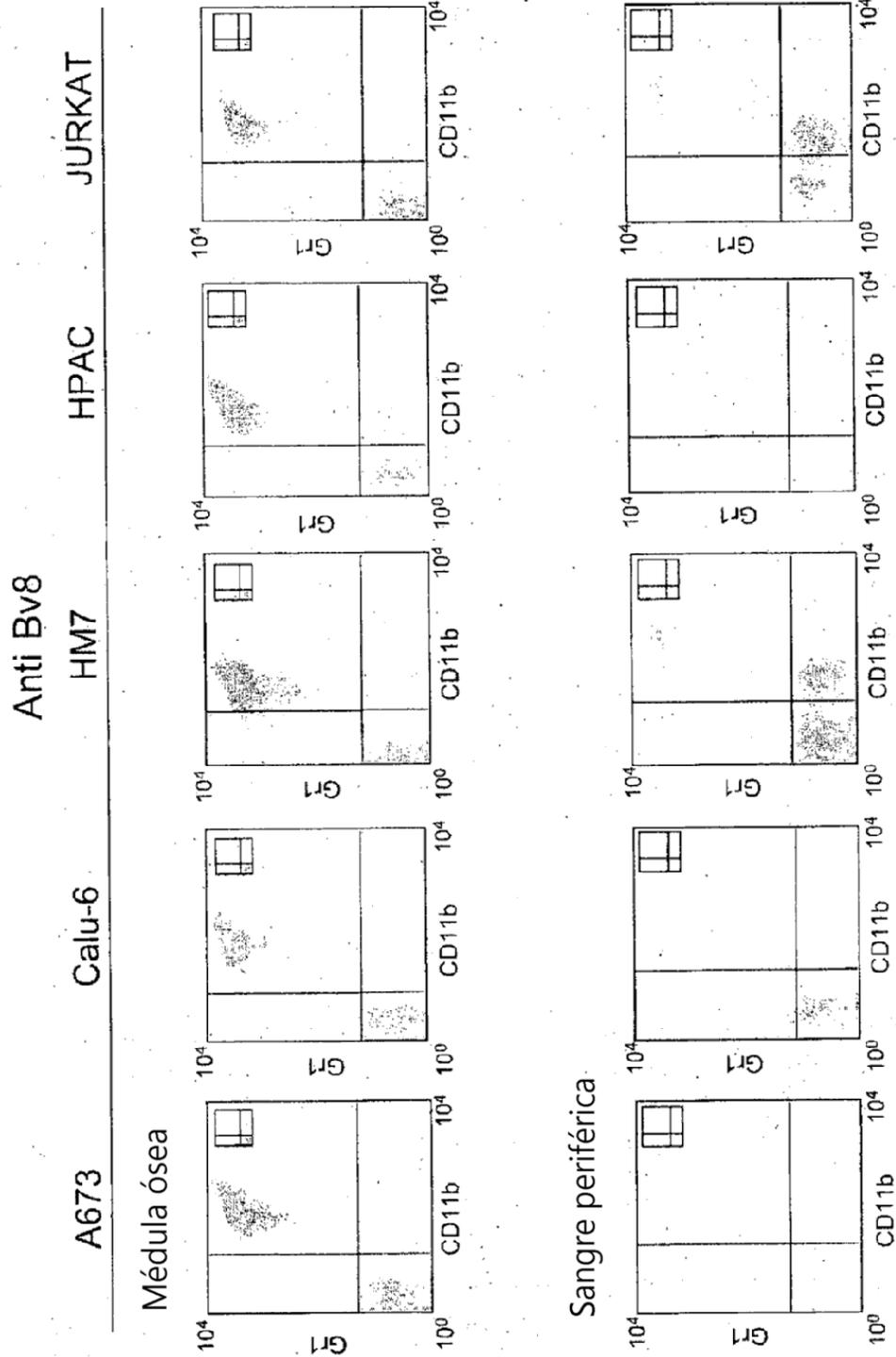


FIG. complementaria 6a

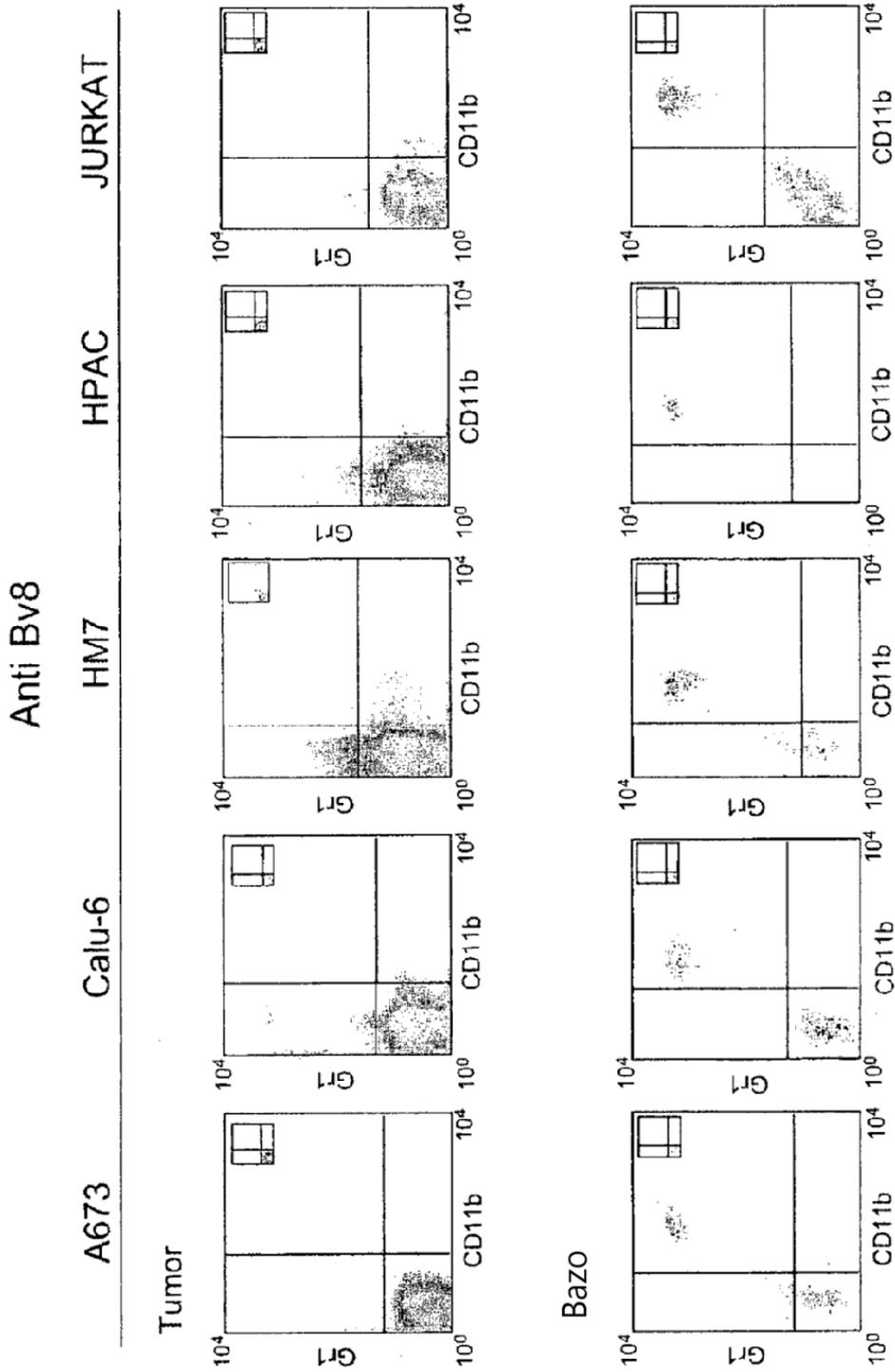


FIG. complementaria 6b

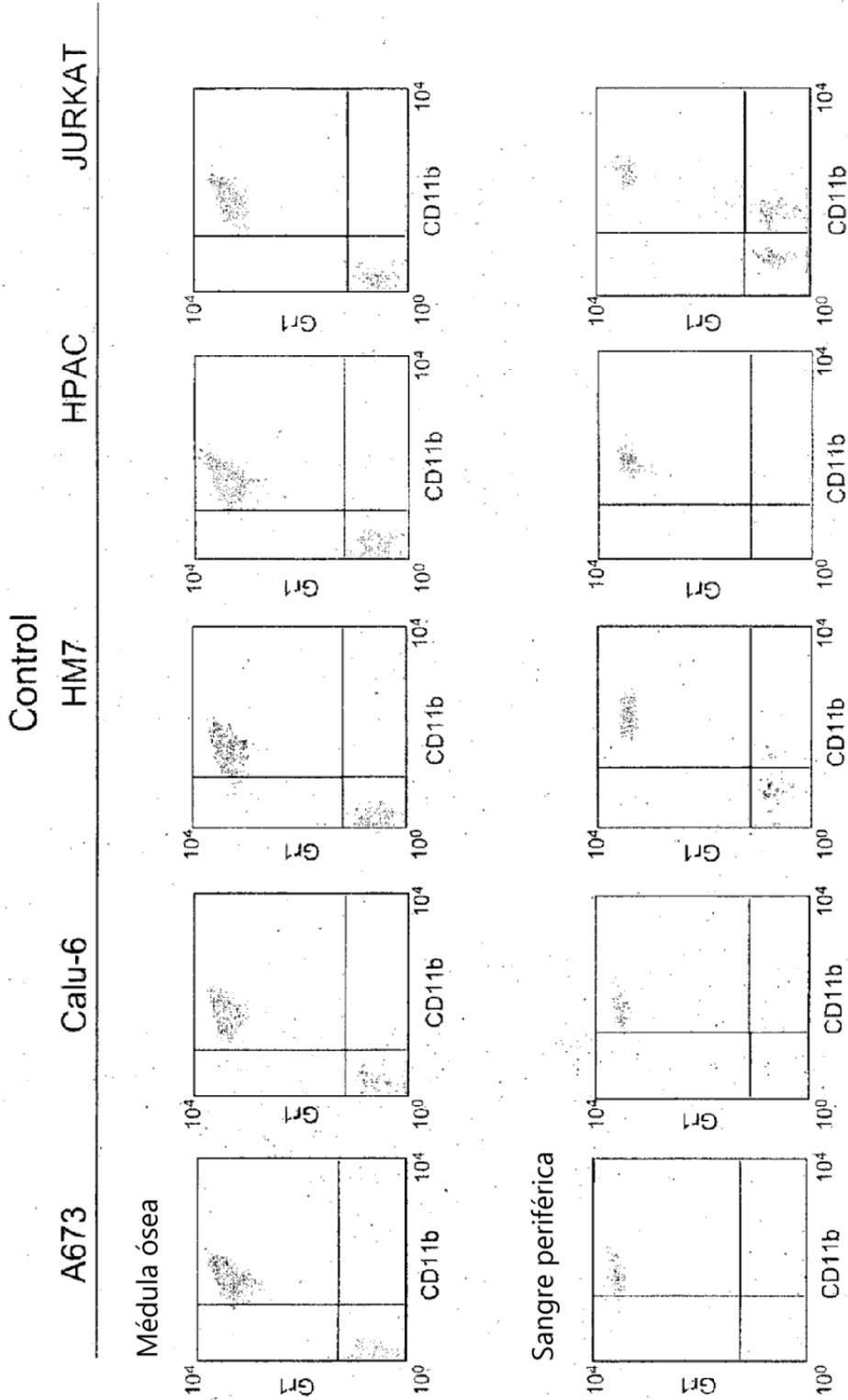


FIG. complementaria 6c

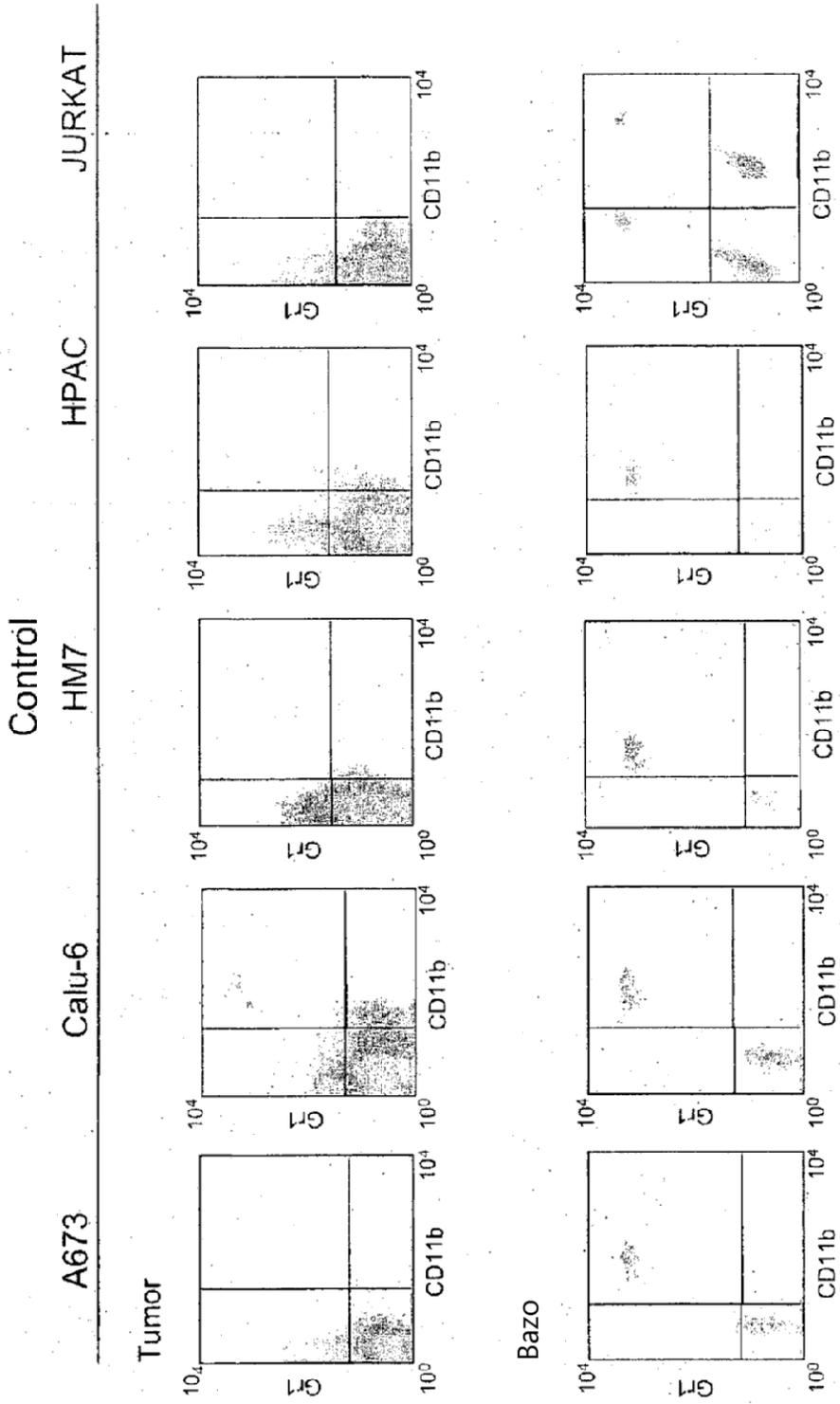


FIG. complementaria 6d

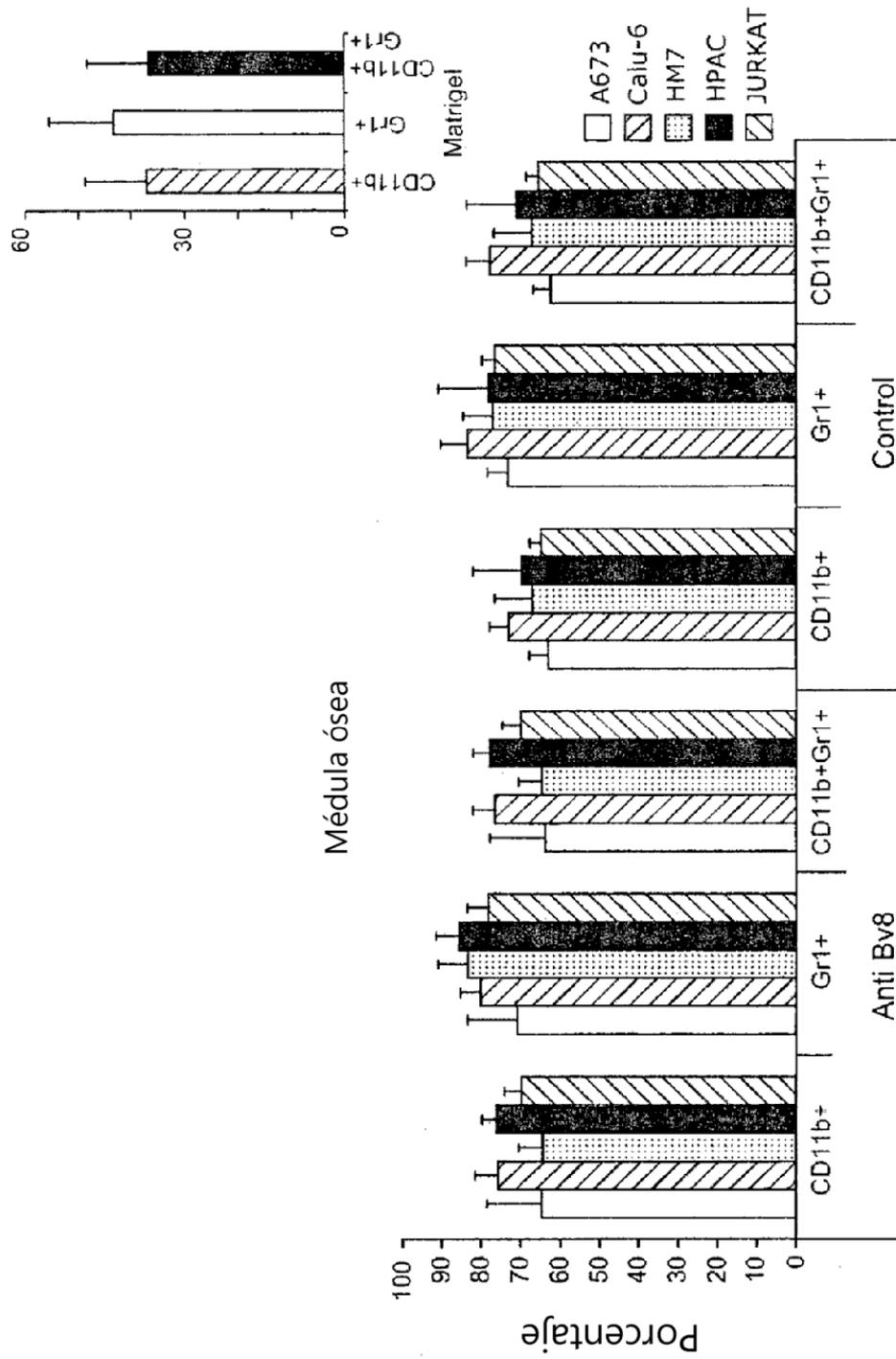


FIG. complementaria 7a

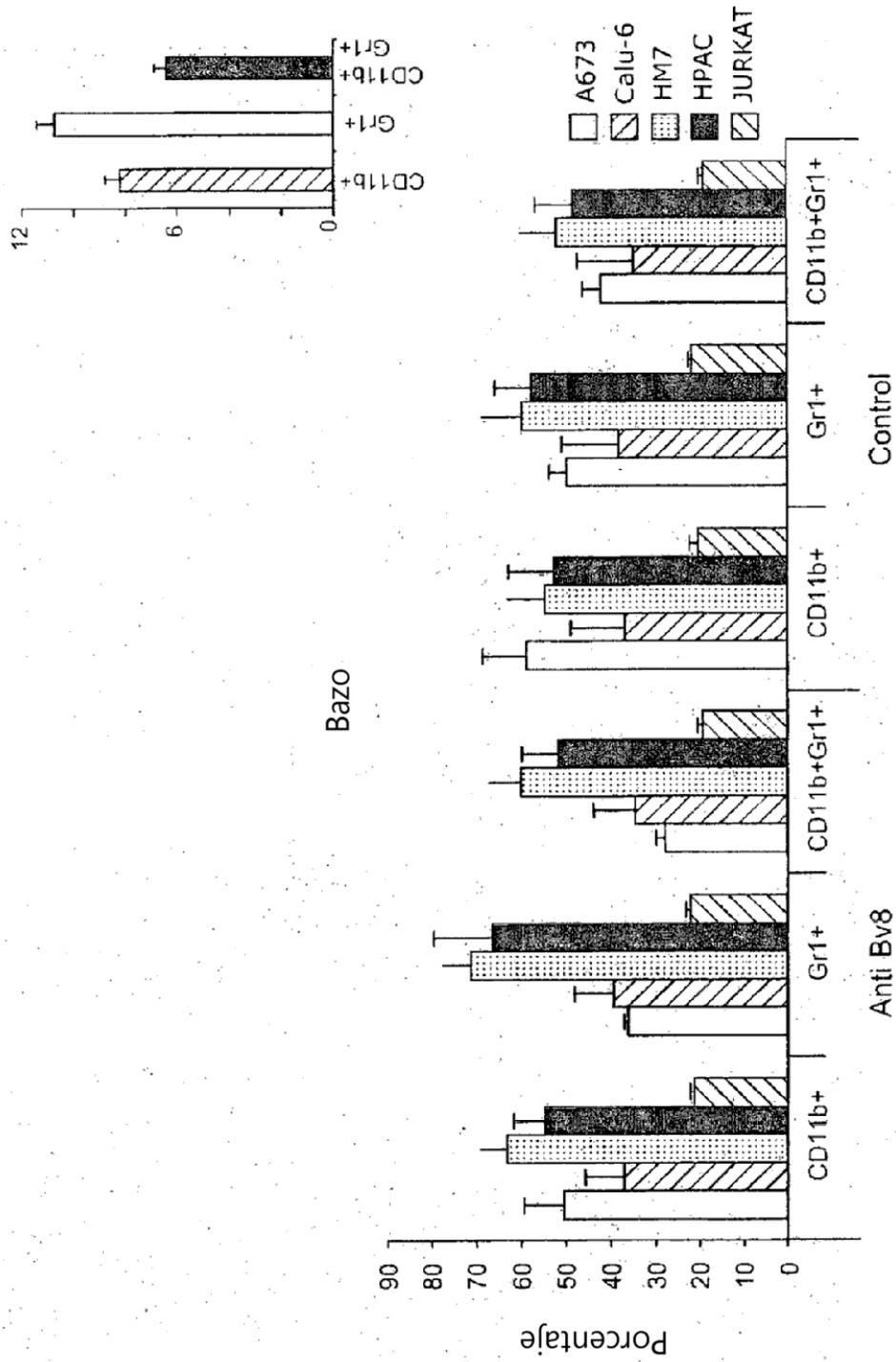


FIG. complementaria 7b

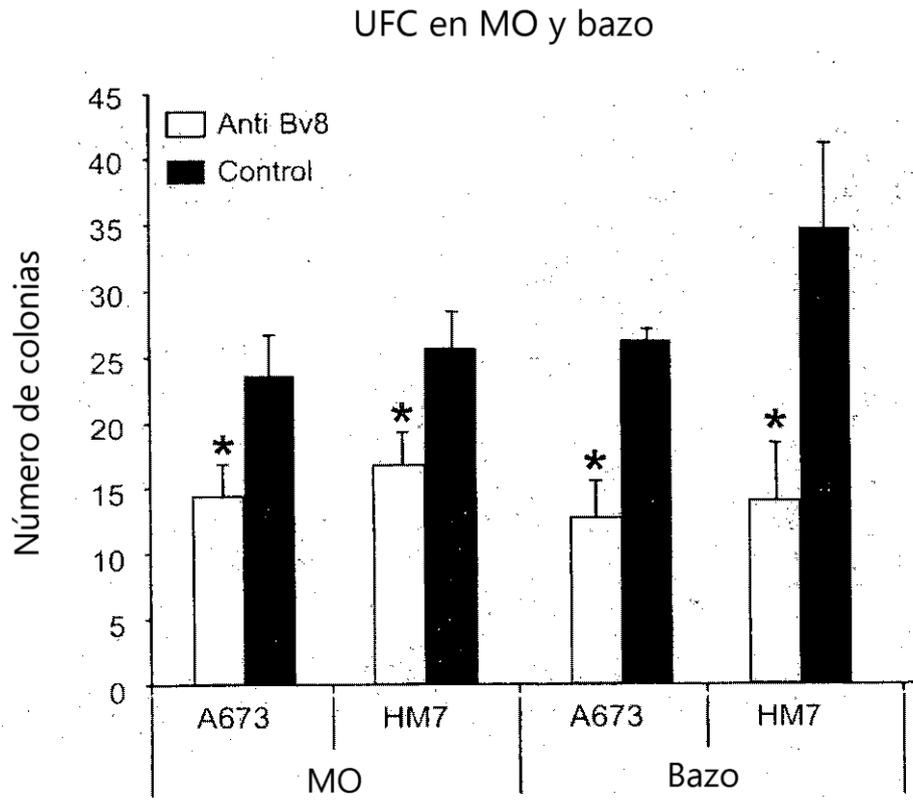


FIG. complementaria 7c

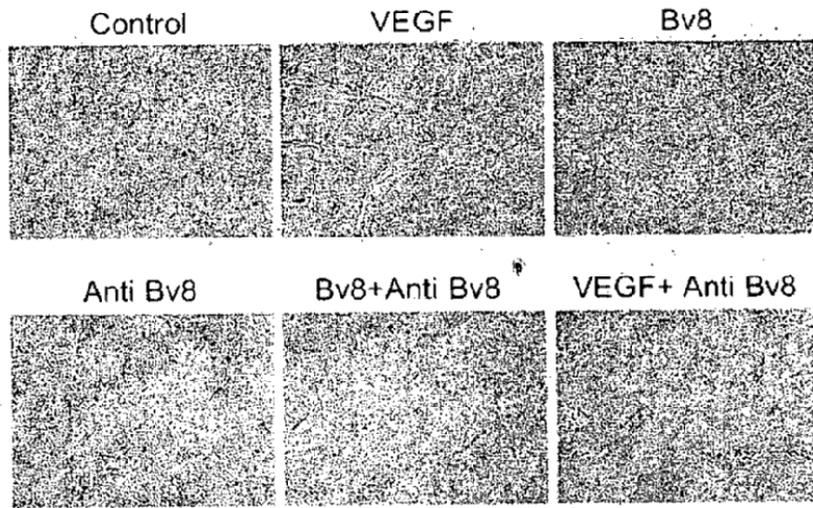


FIG. complementaria 8a

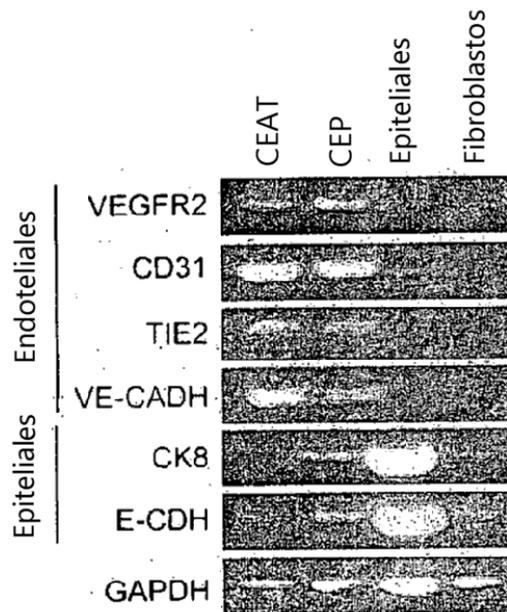


FIG. complementaria 8b

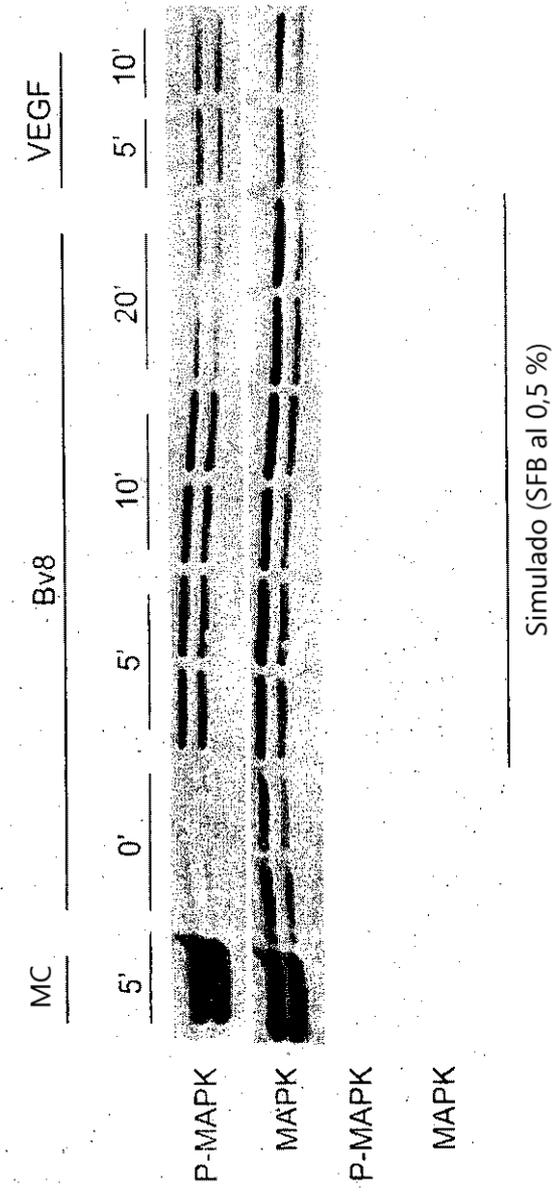


FIG. complementaria 8c

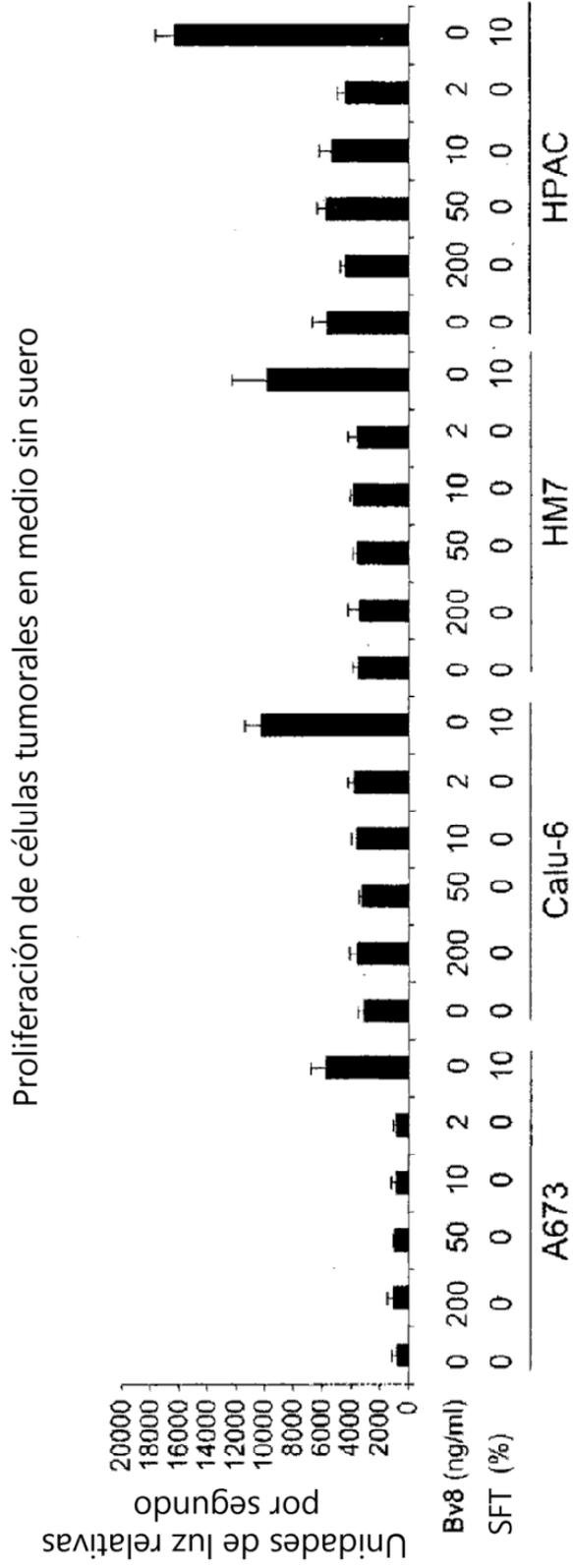


FIG. complementaria 8d

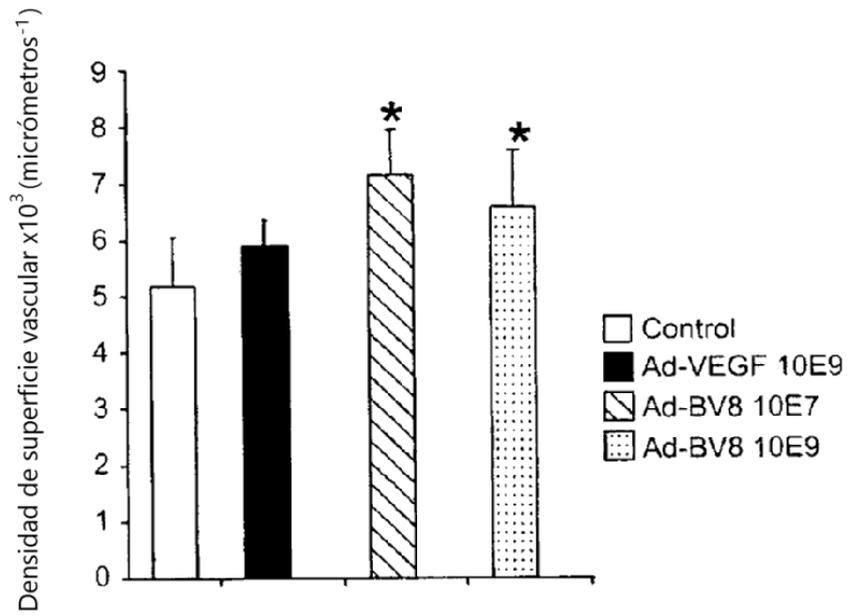


FIG. complementaria 9a

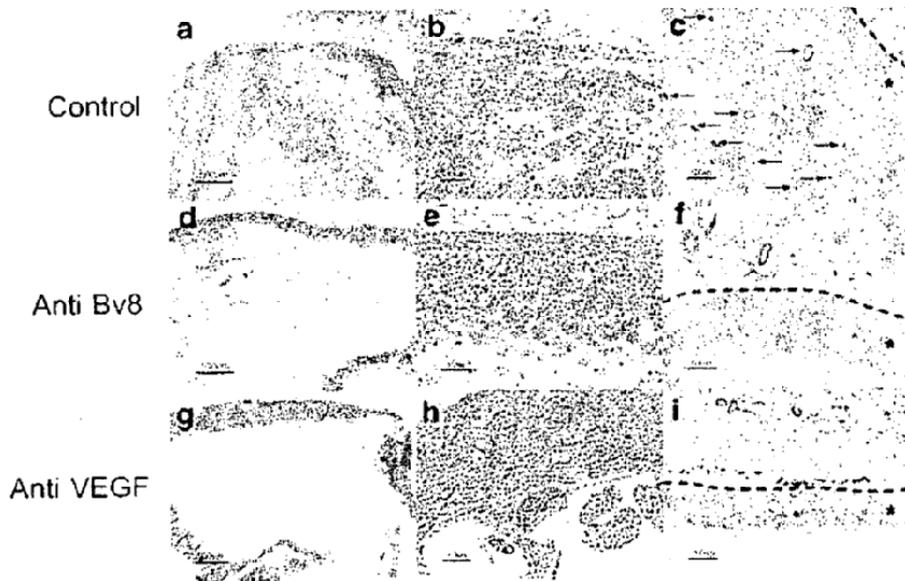


FIG. complementaria 9b

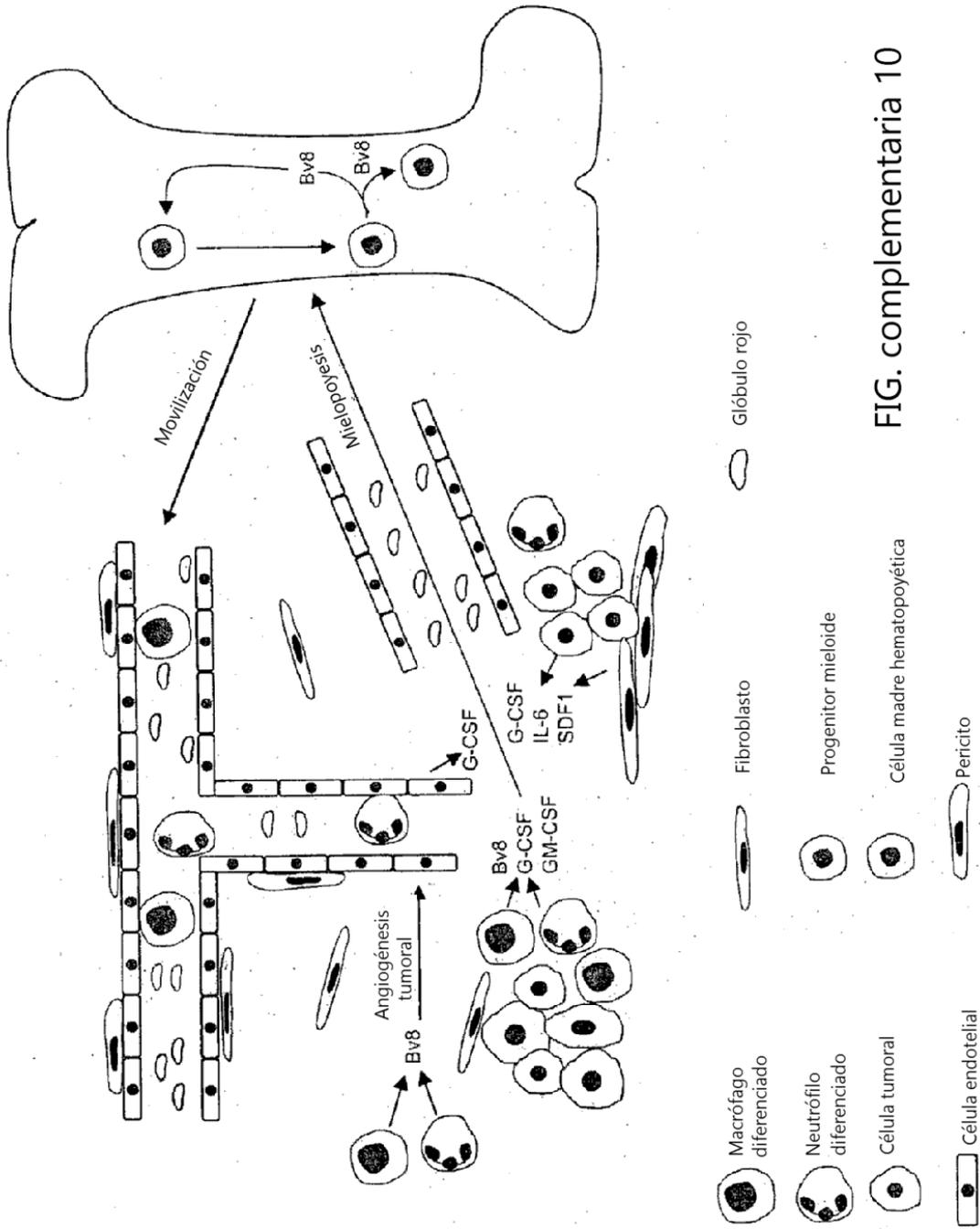


FIG. complementaria 10

Niveles de citocinas en medio condicionado de células tumorales de ser humano o de fibroblastos de ratón asociados a tumor aislados y cultivados de xenoinjertos

Fuente	IL-6	G-CSF	SDF-1
A673	138,7	20,6	15,6
HM7	1,1	1,3	16,4
HPAC	398,2	11,1	30,4
Calu-6	65	8,3	59,2
Fibroblastos obtenidos de HM7	892,1	60	27000
Fibroblastos obtenidos de HPAC	789,2	37,1	18000
Fibroblastos obtenidos de Calu-6	1487,7	163	17800

Los valores (pg/ 3×10^5 células) son el promedio de determinaciones por duplicado que variaron < 10 %.
Los ensayos específicos de especie apropiados se realizaron para cada citocina.

Tabla complementaria 1

Líneas celulares	Tipo celular	G-CSF	GM-CSF
HL-60	promieloblasto	1,1	0,8
KG-1	mieloblasto de médula ósea	1,9***	0,5
Hel 92.1.7	eritroblasto de médula ósea	3,3***	0,2
U-937	monocito	2,2***	1,5
Jurkat	linfocito T	0	0
K562	linfoblasto de médula ósea	0	0

Tabla complementaria 2