

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 356**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08846743 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2219672**

54 Título: **Composiciones de anticuerpos dirigidos contra VEGF y procedimientos**

30 Prioridad:

09.11.2007 US 987015 P

16.10.2008 US 106047 P

24.10.2008 US 108023 P

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

31.05.2016

73 Titular/es:

PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

14272 Franklin Avenue, Suite 100

Tustin, CA 92780, US y

AFFITECH RESEARCH AS (50.0%)

72 Inventor/es:

KAVLIE, ANITA y

SCHLUNEGGER, KYLE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 572 356 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de anticuerpos dirigidos contra VEGF y procedimientos.

5 ANTECEDENTE DE LA INVENCION

2. Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de anticuerpos, a la angiogénesis y tratamiento tumoral. Más en particular, proporciona anticuerpos dirigidos contra VEGF humanos que inhiben de manera específica la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores de VEGF. Dichos anticuerpos se diseñan para inhibir la angiogénesis y para inducir la remisión tumoral, y tienen también seguridad mejorada debido a sus propiedades bloqueadoras específicas. Las composiciones basadas en anticuerpos y los procedimientos de la invención también se extienden al uso de inmunoconjugados y otras combinaciones terapéuticas, kits y procedimientos.

3. Descripción de la técnica relacionada

La resistencia de células tumorales a los agentes quimioterapéuticos representa un problema significativo en la oncología clínica. En realidad, esta es una de las razones principales por las que muchas de las formas más prevalentes de cáncer humano todavía resisten la intervención quimioterapéutica eficaz, a pesar de ciertos avances en este campo.

Otra estrategia de tratamiento tumoral es el uso de una "inmunotoxina", en la cual se usa un anticuerpo dirigido contra células tumorales para suministrar una toxina a las células tumorales. Sin embargo, en común con los procedimientos quimioterapéuticos, la terapia de inmunotoxina también tiene desventajas significativas cuando se aplica a tumores sólidos. Por ejemplo, las células negativas al antígeno o deficientes del antígeno pueden sobrevivir y repoblar el tumor o conducir a la metástasis adicional.

Una razón adicional para la resistencia de los tumores sólidos a terapias basadas en anticuerpos es que la masa tumoral en general es impermeable a agentes macromoleculares tales como anticuerpos e inmunotoxinas (Burrows y col, 1992; Dvorak y col, 1991a; Baxter y Jain, 1991). Tanto las distancias de difusión física como la presión intersticial dentro del tumor son limitaciones significativas a este tipo de terapia. Por lo tanto, los tumores sólidos, que pueden constituir más de 90 % de todos los cánceres humanos, hasta ahora han demostrado ser resistentes al tratamiento con anticuerpos e inmunotoxinas.

Una estrategia más reciente ha sido dirigirse a la vasculatura de tumores sólidos. El dirigirse a los vasos sanguíneos de los tumores en lugar de a las propias células tumorales, tiene ciertas ventajas en cuanto que no es probable que conduzca al desarrollo de células tumorales resistentes, y que las células objetivo están fácilmente accesibles. Además, la destrucción de los vasos sanguíneos conduce a amplificación del efecto anti-tumoral, puesto que muchas células tumorales dependen de un vaso único para su oxígeno y nutrientes (Burrows y Thorpe; 1993; 1994). Las estrategias de ejemplo que se dirigen a la vasculatura se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.855.866 y 5.965.132, que describen en particular el suministro dirigido de agentes anticelulares y toxinas a marcadores de la vasculatura tumoral.

Otra versión eficaz del procedimiento de dirigirse a la vasculatura es dirigir un factor de coagulación a un marcador expresado o adsorbido dentro de la vasculatura tumoral (Huang y col, 1997; patentes de EE.UU. nº 5.877.289, 6.004.555, y 6.093.399). El suministro de coagulantes, en lugar de toxinas, a la vasculatura tumoral tiene las ventajas adicionales de menor inmunogenicidad e incluso menor riesgo de efectos secundarios tóxicos. Como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.877.289, un factor de coagulación preferido para usar en estos "coaguligandos" específicos de tumor es una versión truncada de la proteína inductora de coagulación humana, el factor tisular (FT), el iniciador principal de la coagulación sanguínea.

Aunque el suministro específico de toxinas y factores de coagulación a vasos sanguíneos tumorales representa un avance significativo en el tratamiento tumoral, algunas células tumorales periféricas pueden sobrevivir a la destrucción intratumoral causada por estas terapias. Por lo tanto, las estrategias anti-angiogénicas deberían ser útiles en combinación con los procedimientos de destrucción tumoral de las patentes de EE.UU. nº 5.855.866 y 6.004.555.

Las estrategias del tratamiento tumoral anti-angiogénicas se basan en inhibir la proliferación de vasos que nacen, en

general en la periferia de un tumor sólido. Estas terapias son en particular eficaces en la reducción del riesgo de micrometástasis y en la inhibición del crecimiento de un tumor sólido después de, o junto con, más intervención convencional (tal como cirugía o quimioterapia).

5 La angiogénesis es el desarrollo de nueva vasculatura a partir de vasos sanguíneos preexistentes y/o de células madre endoteliales en circulación (Asahara y col., 1997; Springer y col., 1998; Folkman y Shing, 1992). La angiogénesis tiene una función vital en muchos procesos fisiológicos, tales como la embriogénesis, curación de heridas y menstruación. La angiogénesis también es importante en ciertos sucesos patológicos. Además de una función en el crecimiento y metástasis de tumores sólidos, otras afecciones destacables con un componente
10 angiogénico son artritis, psoriasis y retinopatía diabética (Hanahan y Folkman, 1996; Fidler y Ellis, 1994).

La angiogénesis es regulada en tejidos normales y malignos por el equilibrio de estímulos angiogénicos e inhibidores angiogénicos que se producen en el tejido objetivo y en sitios distantes (Fidler y col., 1998; McNamara y col., 1998). El factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF, también conocido como factor de permeabilidad
15 vascular, VPF) es un estimulante primario de la angiogénesis. El VEGF es una citoquina multifuncional que es inducida por hipoxia y mutaciones oncogénicas y puede ser producida por una amplia variedad de tejidos (Kerbel y col., 1998; Mazure y col., 1996).

El reconocimiento del VEGF como un estímulo primario de la angiogénesis en afecciones patológicas ha conducido
20 a varios intentos de bloquear la actividad del VEGF. Se han propuesto anticuerpos inhibidores dirigidos contra el receptor de VEGF, construcciones de receptores solubles, estrategias antisentido, aptámeros de ARN contra VEGF e inhibidores de receptor tirosina quinasa (RTK) de VEGF de bajo peso molecular para usar en la interferencia con la señalización del VEGF (Siemeister y col., 1998). Después de la inhibición del crecimiento tumoral en ratones usando un anticuerpo murino, (Kim y col., 1993; Asano y col., 1998; Mesiano y col., 1998; Luo y col., 1998a; 1998b; Borgstrom
25 y col., 1996; 1998), se ha aprobado para uso clínico un anticuerpo humanizado dirigido contra VEGF llamado Avastin (bevacizumab) (Presta y col., 1997) (Hurwitz y col., 2004).

Se han descrito otros anticuerpos murinos que reconocen el VEGF e inhiben funciones inducidas por VEGF. Estos incluyen el anticuerpo murino llamado 2C3, que tiene la ventaja de inhibir la unión de VEGF a solo uno de los dos
30 receptores principales de VEGF (Brekken y col., 2000). Al bloquear la unión de VEGF a VEGFR2, pero no a VEGFR1, el anticuerpo murino 2C3 tiene un perfil mejorado de seguridad, manteniendo los efectos beneficiosos mediados por VEGFR1 (Brekken y col., 2000; patentes de EE.UU. n° 6.342.219, 6.524.583, 6.342.221).

Sin embargo, los autores de la invención han reconocido que la identificación de agentes adicionales que
35 reconozcan el VEGF e inhiban la angiogénesis inducida por el VEGF, serían beneficiosos aumentando el número de opciones terapéuticas. Por ejemplo, el anticuerpo murino 2C3, aunque es prometedor, tiene ciertas limitaciones. En particular, el anticuerpo 2C3 no se une al VEGF de ratón, lo que significa que no se puede usar en estudios preclínicos que usan tumores singénicos de ratón. La traducción más eficaz de estudios preclínicos al uso se beneficiaría así del desarrollo de un nuevo anticuerpo que se una tanto a VEGF de ratón como humano.
40

Además, los autores de la invención han reconocido que el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de seres humanos que sean mejor tolerados desde una perspectiva inmunológica, sería ventajoso. A este respecto, los anticuerpos humanos tienen en general al menos tres ventajas potenciales para el uso en terapia humana. Primero, el sistema inmunitario humano no debería reconocer el anticuerpo como extraño. Segundo, la semivida en la
45 circulación humana será similar a los anticuerpos humanos que se presentan de manera natural, permitiendo que se den dosis más pequeñas y menos frecuentes. Tercero, debido a que la parte efectora es humana, interactuará mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano, por ejemplo, para destruir las células objetivo más eficazmente por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
50

Sin embargo, aunque se reconoce en general que los anticuerpos humanos presentan estas ventajas, se sabe que el desarrollo de anticuerpos humanos que tengan afinidades altas suficientes y propiedades funcionales adecuadas para ser los candidatos para terapia humana satisfactoria no es de ninguna manera directo. Por lo tanto, la técnica todavía carece de agentes que inhiban la angiogénesis inducida por el VEGF para el tratamiento seguro y eficaz de
55 seres humanos y plantea retos al desarrollo de estos agentes.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención supera ciertas limitaciones de la técnica anterior al proporcionar nuevas composiciones

terapéuticas y procedimientos para usar en el tratamiento antiangiogénico y antitumoral. La invención se basa en anticuerpos humanos que tienen la propiedad funcional de inhibir específicamente la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores principales de VEGF, y tienen una afinidad por VEGF suficientemente alta para regímenes de tratamiento eficaces. Estos anticuerpos inhiben la angiogénesis y tratan tumores tan eficazmente como otros anticuerpos dirigidos contra VEGF, incluyendo los ya aprobados para uso clínico, y además tienen seguridad mejorada debido a sus propiedades bloqueadoras específicas. Las composiciones y procedimientos de la invención también se extienden al uso de inmunoconjugados y combinaciones, incluyendo profármacos, usando la categoría específica de anticuerpos proporcionados.

10 Una ventaja particular de la presente invención es que los anticuerpos humanos proporcionados inhiben la unión de VEGF solo a VEGFR2, y no a VEGFR1. Esto contrasta con los anticuerpos principales de la técnica anterior, incluyendo A4.6.1 y la versión humanizada Avastin, que inhibe la unión de VEGF tanto a VEGFR2 como a VEGFR1. Puesto que VEGFR1 tiene importantes funciones biológicas no relacionados con la angiogénesis, p. ej., en la función de osteoclastos y condrocitos, la presente capacidad para inhibir solo la angiogénesis mediada por VEGFR2 es una ventaja distinta. Esto se traduce en notables beneficios clínicos en cuanto que no se afecta de manera adversa el metabolismo óseo, p. ej., en el tratamiento de cánceres pediátricos. Los efectos dañinos de los macrófagos en el progreso y metástasis tumoral también se inhiben, puesto que esta población de macrófagos expresa VEGFR2, que es inhibido por los anticuerpos de la invención.

20 Una ventaja adicional es que, puesto que la unión de VEGF a VEGFR1 se mantiene en la presencia de los anticuerpos de la invención, se pueden usar para suministrar de manera específica agentes terapéuticos unidos a la vasculatura tumoral en virtud de la unión a VEGF que se une a VEGFR1, que es regulado por aumento en el endotelio tumoral. En el contexto de inmunoconjugados, por lo tanto, la presente invención proporciona agentes que tienen tanto propiedades antiangiogénicas como destructivas de tumor dentro de la misma molécula.

25 Existe todavía una ventaja en la capacidad de las composiciones proporcionadas para neutralizar la señal de supervivencia del VEGF, que es mediada a través de VEGFR2. Los anticuerpos desnudos y conjugados de la invención forman así combinaciones sinérgicas con otras terapias y/o agentes unidos, en particular aquellos procedimientos y agentes que no logran eficacias máximas *in vivo* debido a la capacidad de VEGF para contrarrestar sus propiedades destructivas.

Las secuencias de aminoácidos y/o ADN de las moléculas de anticuerpo de la invención que se unen al VEGF, sus dominios V_H y V_L incluyendo regiones determinantes de complementariedad (CDR), se exponen en las diferentes SEQ ID NO listadas en la presente memoria.

35 La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une al VEGF y que comprende al menos una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR, en el que dicha región variable de la cadena ligera comprende:

40 (a) una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(b) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

45 (c) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:

50 (d) una CDR1 de cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(e) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(f) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos comparado con la secuencia de CDR dada; y donde dicho anticuerpo aislado que tiene dicha secuencia sustancialmente homóloga

5 (i) se une al menos al VEGF humano y al VEGF de ratón,

(ii) inhibe significativamente la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt1), y

10 (iii) retiene la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo de VEGF que el reconocido por un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una CDR1 de la cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y una
15 CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En una realización preferida, dicho anticuerpo comprende una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una CDR1 de la cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
20

La presente invención proporciona también un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de la invención unido a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico.

25 La presente invención también proporciona una composición que comprende al menos un primer anticuerpo de la invención o un inmunoconjugado del mismo, preferiblemente dicha composición es una composición farmacéuticamente aceptable y opcionalmente dicha composición o composición farmacéuticamente aceptable comprende además al menos un segundo agente terapéutico.

30 La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una región de secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la invención, preferiblemente o bien

(i) dicha región de secuencia de nucleótidos codifica un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma, donde dicha región de secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20, o

(ii) dicha región de secuencia de nucleótidos codifica un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, donde preferiblemente dicha región de secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 24 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 y dicha región de secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 25 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23.
40

45 La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

La presente invención también proporciona una célula hospedante o virus que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención o el vector de expresión de la invención.

50 La presente invención también proporciona un kit que comprende, en al menos un primer envase: el anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector de expresión o la célula hospedante o virus de la invención.

55 La presente invención también proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende:

(a) cultivar una célula hospedante que comprende el vector de expresión de la invención en condiciones eficaces para expresar el anticuerpo codificado; y

(b) obtener el anticuerpo expresado de dicha célula hospedante.

La presente invención también proporciona un procedimiento de unión del VEGF, que comprende poner en contacto una composición que comprende VEGF con el anticuerpo de la invención, o un inmunoconjugado del mismo.

5

La presente invención también proporciona un procedimiento de detección del VEGF, que comprende poner en contacto una composición que se sospecha que contiene VEGF con el anticuerpo de la invención, o un inmunoconjugado del mismo, en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo, y detectar los complejos así formados.

10

La presente invención también proporciona un procedimiento in vitro de diagnóstico de una enfermedad angiogénica o una enfermedad linfangiogénica en un animal, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho animal con el anticuerpo de la invención, o un
15 inmunoconjugado del mismo, en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo;

(b) detectar los complejos de VEGF/anticuerpo así formados, determinando así la cantidad de VEGF en dicha muestra de ensayo; y

(c) comparar la cantidad de VEGF en dicha muestra de ensayo con la cantidad de VEGF en una muestra de control correspondiente, donde una mayor cantidad de VEGF en dicha muestra de ensayo con respecto a la cantidad de VEGF en dicha muestra de control indica una enfermedad angiogénica o una enfermedad linfangiogénica.

La presente invención también proporciona el anticuerpo de la presente invención, o un inmunoconjugado del
25 mismo, para usar en terapia o diagnóstico in vivo. En una realización preferida, dicha terapia es de una enfermedad angiogénica, por inhibición de la angiogénesis, o de una enfermedad linfangiogénica por inhibición de la linfangiogénesis, y dicho diagnóstico in vivo es de una enfermedad angiogénica o linfangiogénica.

También se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF que comprende un dominio
30 CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Alternativamente o además, el anticuerpo descrito en el presente documento que se une al VEGF comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia
35 sustancialmente homóloga a la misma.

Alternativamente o además, el anticuerpo descrito en el presente documento que se une al VEGF comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia
40 sustancialmente homóloga a la misma.

Alternativamente o además, el anticuerpo descrito en el presente documento que se une al VEGF comprende un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia
sustancialmente homóloga a la misma.

45 Alternativamente o además, el anticuerpo descrito en el presente documento que se une al VEGF comprende un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Alternativamente o además, el anticuerpo descrito en el presente documento que se une al VEGF comprende un
50 dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Por lo tanto, se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF que comprende uno o más dominios CDR de cadena pesada, donde el dominio
55 CDR de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(b) un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(c) un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

También se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF que comprende uno o más dominios CDR de cadena ligera, donde el dominio CDR de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en:

10

(a) un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(b) un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(c) un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

20 En algunos ejemplos descritos en el presente documento, el anticuerpo que se une al VEGF comprende tanto

(a) un CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, como

25 (b) un CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En algunos ejemplos, también están presentes un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

30

35 En un ejemplo descrito en el presente documento, la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en una combinación.

40

En otro ejemplo más descrito en el presente documento, la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en una combinación.

45

Visto de forma alternativa, en algunos ejemplos, se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF que comprende

50 un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. Dicho anticuerpo opcionalmente comprende además

55 un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o comprende además

un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o

un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Visto de forma alternativa, en algunos ejemplos, se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF que comprende

10 un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. Dicho anticuerpo opcionalmente comprende además

15 un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o comprende además

20 un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o

un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

25 Visto de forma alternativa, en algunos ejemplos, se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF que comprende

un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. Dicho anticuerpo opcionalmente comprende además

30 un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o comprende además

un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o

un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

45 Algunos anticuerpos descritos en el presente documento comprenden una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO anteriores.

Algunos anticuerpos descritos en el presente documento comprenden dos o más de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 o 10, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEQ ID NO anteriores. Las moléculas de unión especialmente preferidas comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 o 10, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEQ ID NO anteriores (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

50 Algunos otros anticuerpos descritos en el presente documento comprenden dos o más de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 o 7, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEQ ID NO anteriores. Las moléculas de unión especialmente preferidas comprenden 3 de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEQ ID NO anteriores (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas o secuencias sustancialmente

homólogas a las mismas).

Algunos anticuerpos especialmente más preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 o 10, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 o 7, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

10 Algunos anticuerpos especialmente preferidos comprenden

un dominio CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 5,
un dominio CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y
un dominio CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 7,

15 o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias mencionadas antes;
y comprenden

un dominio CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 8,
un dominio CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 9, y
20 un dominio CD3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 10,
o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias mencionadas antes.

También se describe en el presente documento un anticuerpo que se une al VEGF y que comprende al menos una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de la cadena ligera
25 que comprende al menos tres CDR, donde dicha región variable de la cadena ligera comprende:

(i) una CDR1 de región variable ligera (VL) CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,
(ii) una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y
(iii) una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

30 En un ejemplo, una o más de dichas CDR de la región variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en:

(i) una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,
35 (ii) una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y
(iii) una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un ejemplo adicional, dos de dichas CDR de la región variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en:

40 (i) una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,
(ii) una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y
(iii) una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

45 En otro ejemplo más, y en una realización de la invención, tres de dichas CDR de la región variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en:

(i) una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,
(ii) una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y
50 (iii) una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Algunas realizaciones preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une al VEGF y que comprende:

55 un dominio VH que comprende tres CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 o 7, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEQ ID NO: 5, 6, o 7, y
un dominio VL que comprende tres CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 o 10, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEQ ID NO: 8, 9 o 10.

De acuerdo con la presente invención, los dominios VL comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 y 10, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEQ ID NO: 8, 9 o 10, (es decir, una de cada una de las CDR1, CDR2 y CDR3 o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

- 5 De acuerdo con la presente invención, los dominios VH comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de SEQ ID NO: 5, 6 o 7 (es decir, una de cada una de las CDR1, CDR2 y CDR3 o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Realizaciones más especialmente preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo que se une al VEGF y que
10 comprende:

un dominio VL que comprende 3 CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 y 10, y
un dominio VH que comprende 3 CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 y 7.

- 15 Algunas realizaciones preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo que se une al VEGF y que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

- 20 Realizaciones adicionales preferidas proporcionan un anticuerpo que se une al VEGF y que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

- En una realización adicional más, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (dicho anticuerpo que también se denomina en el presente documento r84 o PGN311 o EJ173/112-C11), o que comprende un fragmento del mismo que se une a VEGF, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

- En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende la
30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (dicho anticuerpo que también se denomina en el presente documento r84 o PGN311 o EJ173/112-C11), o que comprende un fragmento de la misma que se une a VEGF.

- La invención se ilustra mediante el anticuerpo monoclonal r84 (también denominado en el presente documento PGN311 y EJ-173-112-C11), cuya forma de cadena simple se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO:
35 20) y una forma de IgG de longitud completa la cual se muestra en el ejemplo 6. Los dominios de CDR, los dominios VH y VL del anticuerpo r84 se muestran en la tabla 1 y en la figura 1. Los anticuerpos que comprenden estos dominios de CDR o dominios VH y VL (o secuencias sustancialmente homólogas a estos) son aspectos preferidos de la invención.

- 40 Una realización preferida de la invención es una forma scFv del anticuerpo r84 mostrada en la SEQ ID NO:21 (aminoácidos), que es codificada preferiblemente por la SEQ ID NO: 20 (ácido nucleico).

- Otra realización preferida de la invención es una forma IgG de longitud completa del anticuerpo r84, cuya cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 24 (aminoácidos), que es codificada preferiblemente por la SEQ ID NO: 22
45 (ácido nucleico); y cuya cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 25 (aminoácidos), que es codificada preferiblemente por la SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico).

- Algunos ejemplos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen al menos 70 % de
50 identidad con las secuencias de aminoácidos descritas.

- En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención que se unen a VEGF comprenden al menos una región variable de cadena ligera que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % o 95 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 97
55 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y/o al menos una región variable de cadena pesada que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % o 95 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras de las secuencias de aminoácidos descritas.

5

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen 1, 2 o 3, preferiblemente 1 o 2, aminoácidos alterados en una o más de las regiones CDR descritas. Estas alteraciones pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras de aminoácidos, o una mezcla de las mismas.

10 En todas dichas realizaciones, las alteraciones preferidas son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

En todas dichas realizaciones, los anticuerpos que contienen secuencias sustancialmente homólogas retienen la capacidad para unirse al VEGF.

15 En las realizaciones de la invención donde se contemplan las alteraciones en el dominio de CDR3 de cadena ligera, se prefiere que el resto L en la posición 8 en dicha CDR sea retenido sin variaciones.

Se describen en el presente documento proteínas de unión que se unen a VEGF y que comprenden un anticuerpo de la invención, un dominio VH o VL de la invención, o una o más de las CDR de la invención.

20

Los anticuerpos de la invención comprenden al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR. Se describen en el presente documento secuencias de ejemplo y preferidas para estas CDR.

25 Como se usa en el presente documento el término abreviado "VEGF", a menos que se exponga específicamente de otro modo o esté claro por la terminología científica, significa Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (VEGF-A), también conocido como factor de permeabilidad vascular, VPF.

El "VEGF" también significa cualquier forma de VEGF, en particular puesto que VEGF está conservado a través de las especies de mamífero. Por lo tanto, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden unir al VEGF humano, de mono, vaca (bovino), ratón, rata, hámster, hurón, cobayo y/o conejo, por ejemplo. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unirán al menos al VEGF humano. En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unirán al menos al VEGF humano o de ratón.

35

Como se usa en el presente documento, la expresión "que se une al VEGF" en el contexto de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención, significa anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos que son capaces de uno o más de lo siguiente; preferiblemente, de más de uno de lo siguiente; y lo más preferiblemente, de todo lo siguiente:

40

(a) unirse a un epítipo de VEGF no conformacionalmente dependiente, evaluado por la unión a VEGF en una transferencia Western;

(b) unirse a VEGF libre o a VEGF en un soporte sólido;

45

(c) unirse al menos a VEGF humano y VEGF de ratón;

(d) inhibir significativamente o reducir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1);

50

(e) no inhibir significativamente el VEGF ni reducir la unión al receptor del VEGF VEGFR1 (F1t-1);

(f) inhibir, y preferiblemente, inhibir significativamente, la fosforilación inducida por el VEGF del VEGFR2;

55 (g) inhibir, y preferiblemente, inhibir significativamente, la permeabilidad vascular inducida por el VEGF;

(h) inhibir, y preferiblemente, inhibir significativamente, la proliferación de células endoteliales mediada por el VEGF;

(i) inhibir, y preferiblemente, inhibir significativamente, la angiogénesis;

(j) inhibir, y preferiblemente, inhibir de manera significativa, la linfangiogénesis;

(k) no inhibir significativamente la estimulación mediada por el VEGFR1 o la activación de células, tales como osteoclastos o condrocitos que expresan VEGFR1; y/o

(l) localizar la vasculatura tumoral y/o estroma tumoral tras la administración a un animal de un tumor vascularizado.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo de la invención es uno que inhibe significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir de manera significativa la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR1 (F1t-1).

La presente invención proporciona por lo tanto anticuerpos humanos que bloquean de manera específica la unión del VEGF al receptor VEGFR2, o que bloquean la unión del VEGF esencialmente solo al receptor VEGFR2. Dichos anticuerpos humanos inhiben significativamente la unión del VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor VEGFR1 (F1t-1). Dichos anticuerpos humanos inhiben, por lo tanto, la unión del VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/F1k-1), no inhiben de manera sustancial la unión del VEGF al receptor de VEGFR1 (F1t-1), presentan efectos antiangiogénicos y antitumorales in vivo y no inhiben significativamente los sucesos mediados por el VEGFR1, tales como las funciones de los osteoclastos o condrocitos.

Los anticuerpos humanos de la invención se llaman, por lo tanto, de forma abreviada "anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, que no bloquean VEGFR1, y bloqueantes de VEGFR2". De manera aún más abreviada, se llaman "anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2", que se usa por simplicidad con referencia a todas las composiciones, usos y procedimientos de la invención. Un "anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2" es un anticuerpo humano contra VEGF que bloquea la unión del VEGF a su receptor VEGFR2. Estará claro que dichos anticuerpos no son anticuerpos contra el propio receptor VEGFR.

En vista de esta invención, por lo tanto, se pueden producir una variedad de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 y usar en una variedad de realizaciones, incluyendo en la inhibición de angiogénesis y en el tratamiento de enfermedades angiogénicas y tumores, sin inhibir la señalización de VEGF mediante el receptor VEGFR1 y sin las desventajas notables y los efectos secundarios asociados con esto.

En ciertas realizaciones, la presente solicitud describe además metodología para generar anticuerpos humanos candidatos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 y los aspectos técnicos rutinarios de los ensayos requeridos para identificar anticuerpos reales específicos bloqueantes de VEGFR2 de la mezcla de candidatos.

Como se usa a lo largo de la solicitud completa, los términos "un" y "una" se usan en el sentido que significan "al menos uno", "al menos un primero", "uno o más" o "una pluralidad" de los componentes o etas referidos, excepto en casos en los que se establece específicamente en lo sucesivo un límite superior. Por lo tanto, un "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa "al menos un primer anticuerpo". Los límites y parámetros operables de combinaciones, así como las cantidades de cualquier agente individual, serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente descripción.

Los anticuerpos humanos de la invención que "inhiben de manera específica la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1)" se pueden identificar por ensayos de competición y/o funcionales. Los ensayos preferidos, por simplicidad, son ensayos de competición basados en ELISA. En ensayos de competición, se premezcla o mezcla el VEGF con cantidades variables de los anticuerpos de ensayo (p. ej., exceso molar de 100 veces a 1000 veces, por ejemplo, exceso molar de 500 veces a 750 veces) y determina la capacidad de los anticuerpos de ensayo para reducir la unión del VEGF al VEGFR2. El VEGF se puede marcar previamente y detectar de manera directa, o se puede detectar usando un anticuerpo (secundario) dirigido contra VEGF o un sistema de detección de anticuerpos secundarios y terciarios. Un formato de ELISA de dicho ensayo de competición es un formato preferido, pero se puede llevar a cabo cualquier tipo de ensayo de inmunocompetición.

La unión del VEGF al VEGFR2 en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (incluyendo anticuerpos monoclonales dirigidos contra VEGF no bloqueantes) es el valor de control alto (100 %) en este ensayo de competición. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la unión del VEGF al VEGFR2 en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que inhibe de manera significativa la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1).

Una reducción significativa es una reducción de la unión “reproducible”, es decir, observada de manera consistente. Una “reducción significativa” en términos de la presente solicitud se define como una reducción reproducible (de la unión del VEGF al VEGFR2) de al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 % o aproximadamente 65 %, con cualquiera cantidad entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces (por ejemplo, aproximadamente 500 veces o aproximadamente 750 veces) de exceso molar del anticuerpo frente al VEGF. Visto de manera alterativa, una señal de menos de 50 % (cuando se compara a un valor de control de 100 %) se considera inhibición significativa de la unión.

Una característica preferida de la invención es que los anticuerpos humanos proporcionados no inhiben, reducen ni bloquean de manera sustancial o significativa la unión del VEGF al VEGFR1. Los anticuerpos humanos que presentan una reducción moderadamente significativa de la unión del VEGF al VEGFR2 serán aún útiles, siempre que no inhiban de manera sustancial la unión del VEGF al VEGFR1. Sin embargo, los anticuerpos más preferidos serán aquellos que tienen una capacidad más significativa para inhibir la unión del VEGF al VEGFR2. Estos anticuerpos son aquellos que presentan una capacidad reproducible para reducir la unión del VEGF al VEGFR2 en al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 % o aproximadamente 80 %, con cualquier cantidad entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces (por ejemplo, aproximadamente 500 veces o aproximadamente 750 veces) de exceso molar de anticuerpo frente a VEGF. Aunque no se requiere para la práctica de la invención, los anticuerpos que reducen la unión del VEGF al VEGFR2 en al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o incluso más, no se excluyen de ninguna manera.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que inhiben la unión del VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1) se confirman fácilmente por ensayos simples de competición tales como los descritos anteriormente, pero usando VEGFR1.

La ausencia de una inhibición o reducción significativa es un “mantenimiento sustancial de la unión” “reproducible”, es decir, que se observa de manera consistente. Un “mantenimiento sustancial de la unión” en términos de la presente solicitud se define como un mantenimiento reproducible (de la unión del VEGF al VEGFR1) de al menos aproximadamente 60 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 % o aproximadamente 85 %, con cualquier cantidad de entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces de exceso molar del anticuerpo frente al VEGF.

La intención de usar anticuerpos humanos que no inhiban de manera sustancial la unión del VEGF al VEGFR1 es mantener las funciones biológicas mediadas por el VEGFR1. Por lo tanto, un anticuerpo solo necesita mantener suficiente unión del VEGF al VEGFR1 de modo que sea inducida una respuesta biológica por el VEGF. Sin embargo, los anticuerpos más preferidos serán los que tengan una capacidad más significativa para mantener la unión del VEGF al VEGFR1. Estos anticuerpos son los que presentan una capacidad reproducible para mantener la unión del VEGF al VEGFR1 en niveles de al menos aproximadamente 88 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 95 % o de aproximadamente 98-99 %, con cualquier cantidad entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces de exceso molar del anticuerpo frente al VEGF.

Se entenderá que los anticuerpos humanos que inhiben de manera más sustancial la unión del VEGF al VEGFR2 pueden tolerar probablemente más reducción de la unión al VEGFR1. Igualmente, donde un anticuerpo tiene una reducción moderada de la unión del VEGF al VEGFR2, se debe seguir más rigurosamente el mantenimiento de la unión al VEGFR1.

Otro ensayo preferido de unión para identificar y/o confirmar que un anticuerpo inhibe la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) es un ensayo de coprecipitación. Un ensayo de coprecipitación prueba la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión del VEGF a uno o más receptores en solución. En dicho ensayo, el VEGF o VEGF marcado de manera detectable, se incubaba con una forma adecuada del receptor.

Hay muchos formatos para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación y coprecipitación. En el presente caso, una “forma adecuada del receptor” puede ser el receptor VEGFR2 en cuestión o el dominio extracelular del receptor. La inmunoprecipitación entonces requerirá, además de los reactivos estándar, la presencia de un anticuerpo contra el receptor VEGFR2 o un epítipo en el dominio extracelular del receptor distinto del sitio al cual se une el VEGF. La presente invención proporciona otras formas “adecuadas” de los receptores de VEGF, en particular los dominios extracelulares de los receptores enlazados a una parte del anticuerpo Fc. Dichas construcciones de receptor/Fc se pueden precipitar por incubación con una composición inmunoprecipitadora eficaz, tal como una composición

basada en Proteína A.

Independientemente del receptor adecuado, los ensayos de inmunoprecipitación o de coprecipitación se llevan a cabo preferiblemente con controles. La capacidad del VEGF solo, para unirse al receptor elegido se debe confirmar por la precipitación en ausencia de un anticuerpo dirigido contra VEGF. Preferiblemente, se llevan a cabo incubaciones paralelas en presencia o ausencia de un anticuerpo con propiedades conocidas de unión para actuar como un control. Lo más preferiblemente, se ejecutan en paralelo ensayos que usan tanto un anticuerpo bloqueante de control como uno no bloqueante de control.

Después inmunoprecipitan cualesquiera de las especies inmunológicas unidas, por ejemplo, por incubación con una composición inmunoprecipitadora eficaz, tal como una composición de Proteína A o perlas de Proteína A-sefarosa. Después se ensaya en el precipitado la presencia de VEGF. Cuando el VEGF en la incubación inicial era VEGF marcado de manera detectable, tal como VEGF radiomarcado, se puede detectar directamente cualquier VEGF en los inmunoprecipitados. Cualquier VEGF no marcado en los inmunoprecipitados se puede detectar por otros medios adecuados, p. ej., por separación en gel e inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra VEGF.

La capacidad de un anticuerpo humano para bloquear la unión del VEGF a un receptor del VEGF, tal como VEGFR2, en dicho ensayo de coprecipitación se puede cuantificar fácilmente aunque también son valiosos los resultados cualitativos. Se puede lograr la cuantificación por medición directa del VEGF marcado o por ejemplo, por análisis densitométricos del VEGF inmunodetectado. Por lo tanto, los anticuerpos que presentan una capacidad reproducible, es decir, observada de manera consistente, para inhibir la unión del VEGF al VEGFR2 se pueden detectar, y se pueden elegir anticuerpos útiles de acuerdo a los criterios cuantitativos resumidos anteriormente.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF que no inhiben significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR1 (F1t-1) también se pueden identificar fácilmente llevando a cabo ensayos de coprecipitación como se ha descrito antes, pero usando VEGFR1 en lugar de VEGFR2. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra VEGF que inhiben la unión del VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1), también se puede identificar fácilmente usando dichos procedimientos.

La presente solicitud también proporciona varios ensayos funcionales para identificar y/o confirmar que un anticuerpo humano inhibe significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1). Estos se refieren en general a la identificación de VEGFR2 como el receptor responsable de ciertas respuestas biológicas definidas. Aunque los ensayos anteriores tipo competición, que se llevan a cabo en sistemas exentos de células, son más reproducibles, fiables, ahorradores de trabajo y rentables, también son útiles los siguientes ensayos en el contexto de la presente invención.

Por ejemplo, se puede identificar un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, ensayando la capacidad para inhibir el crecimiento de células endoteliales mediado por el VEGF (que inhibe la actividad mitogénica del VEGF). Se puede emplear cualquier ensayo adecuado usando cualquiera de una variedad de células endoteliales en presencia del VEGF con o sin anticuerpos de ensayo. Preferiblemente, se ejecutan en paralelo ensayos por duplicado, tal como sin VEGF y con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueantes como no bloqueantes). El crecimiento de células endoteliales se puede determinar y cuantificar preferiblemente con precisión, por cualquier medio aceptable de determinación del número de células, incluyendo ensayos colorimétricos.

Un anticuerpo humano con capacidad para inhibir el crecimiento de células endoteliales mediado por el VEGF, en general presentará una inhibición consistentemente observada del crecimiento de células endoteliales mediado por el VEGF de aproximadamente 25 %, 30 %, 35 %, 40 % 45 % o 50 % o así. La inhibición en estos intervalos indicará un anticuerpo con propiedades suficientes para inhibir la angiogénesis in vivo. Los anticuerpos con actividad inhibidora más significativa no están excluidos de la invención.

Los ensayos funcionales adicionales para identificar anticuerpos humanos de acuerdo con la presente invención son ensayos para probar el bloqueo de la fosforilación inducida por el VEGF. Se puede usar cualquier ensayo adecuado usando cualquiera de una variedad de células endoteliales que expresan cualquier forma de VEGFR2 fosforilable, natural o recombinante. Las células se incuban con VEGF en presencia o ausencia del anticuerpo que se va a probar durante un período de tiempo adecuado. Preferiblemente se ejecutan ensayos por duplicado en paralelo, tal como sin VEGF y con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueantes como no bloqueantes).

Se puede determinar la fosforilación inducida por el VEGF del VEGFR2 y preferiblemente cuantificar de manera

precisa por cualquier medio aceptable. En general, el VEGFR2 se inmunoprecipita para análisis adicionales. Se puede determinar directamente el grado de fosforilación del VEGFR2, por ejemplo, pueden haber incubado las células con ATP marcado con ^{32}P , que permite la cuantificación directa del ^{32}P dentro del VEGFR2 inmunoprecipitado. Preferiblemente, el VEGFR2 inmunoprecipitado se analiza por otro medio, por ejemplo, por separación en gel e inmunodetección con un anticuerpo que se une a los restos de fosfotirosina. Un anticuerpo humano con la capacidad para inhibir la fosforilación del VEGFR2, inducida por el VEGF, en general presentará una reducción observada de manera consistente, de los niveles de VEGFR2 fosforilado.

Otros ensayos funcionales más para identificar anticuerpos humanos dirigido contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, de acuerdo con la presente invención, son ensayos para ensayar la inhibición de la permeabilidad vascular inducida por VEGF. Aunque se puede usar cualquiera de estos ensayos, un ensayo en particular adecuado es el ensayo de permeabilidad de Miles, donde se inyecta a animales tal como cobayos un colorante, tal como colorante azul de Evan, y se determina la aparición del colorante en la piel del animal después de suministrar VEGF en la presencia o ausencia de los anticuerpos de ensayo. Preferiblemente, se llevan a cabo en paralelo estudios por duplicado, tal como sin VEGF y con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueantes como no bloqueantes). La aparición de colorante en la piel del animal típicamente es en forma de manchas, tal como manchas azules, en el lomo del animal, que se pueden fotografiar y medir.

Los anticuerpos humanos dirigido contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, inhibirán la permeabilidad vascular inducida por el VEGF como una inhibición observada de manera consistente a bajas concentraciones, tal como cuando se suministra un exceso molar de 100 veces, o 1000 veces frente al VEGF. Los anticuerpos que no bloquean la unión del VEGF al VEGFR2 no mostrarán ninguna inhibición significativa de la permeabilidad vascular inducida por el VEGF. En general, los anticuerpos que bloquean la permeabilidad inducida por el VEGF solo a altas concentraciones, tal como con un exceso molar de 10 veces frente al VEGF, no serán anticuerpos con propiedades de acuerdo con la presente invención.

Ensayos funcionales ampliamente aceptados de angiogénesis, y por lo tanto, agentes antiangiogénicos, son el ensayo de microbolsa corneal de neovascularización y el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM). La patente de EE.UU. n° 5.712.291 muestra que los ensayos de microbolsa corneal y de CAM son suficientemente predictivos para identificar agentes para usar en el tratamiento de una variedad extremadamente amplia de enfermedades angiogénicas.

La patente de EE.UU. n° 5.001.116 describe el ensayo de CAM. Esencialmente, se sacan embriones fertilizados de pollo de su cáscara el día 3 o 4, y se implanta en la membrana corioalantoidea un disco de metilcelulosa que contiene el compuesto de ensayo. Los embriones se examinan aproximadamente 48 horas después y se aparece una zona clara sin vasos sanguíneos alrededor del disco de metilcelulosa, se mide el diámetro de esa zona. Como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.712.291, en el contexto de la presente invención, la aparición de cualquier zona sin vasos sanguíneos es suficiente para poner de manifiesto un anticuerpo antiangiogénico. Cuanto mayor sea la zona, más eficaz es el anticuerpo.

El ensayo de microbolsa corneal de la neovascularización se puede practicar usando córneas de rata o conejo. Este modelo in vivo está ampliamente aceptado como predictivo de la utilidad clínica, como se pone de manifiesto por las patentes de EE.UU. n° 5.712.291 y 5.871.723. Aunque no se cree que sea en particular relevante para la presente invención, los ensayos corneales son preferibles frente a los ensayos de CAM porque en general reconocerán compuestos que son inactivos por sí mismos pero son metabolizados para dar compuestos activos.

En la presente invención, el ensayo de microbolsa corneal se usa para identificar un agente antiangiogénico. Esto se pone de manifiesto por una reducción significativa en la angiogénesis, representada por una reducción consistentemente observada y preferiblemente notable del número de vasos sanguíneos dentro de la córnea. Dichas respuestas se definen preferiblemente como aquellas córneas que muestran solo un brote ocasional y/o un bucle de horquilla que no presentaban prueba de crecimiento sostenido cuando se pusieron en contacto con la sustancia de ensayo.

La invención como se reivindica se hace posible de acuerdo con la presente memoria descriptiva y las referencias tecnológicas fácilmente disponibles, el conocimiento técnico y materiales de inicio.

Por lo tanto, algunas realizaciones preferidas de la invención son composiciones que comprenden al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Los anticuerpos humanos dirigido contra VEGF, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que inhiben de manera específica la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1); y los anticuerpos dirigido contra VEGF, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que inhiben la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR1 (F1t-1) forman
5 otros aspectos de la invención.

Se pueden identificar fácilmente anticuerpos humanos con las combinaciones de propiedades deseadas por uno o más o una combinación de los ensayos de competición de receptores, de ELISA, coprecipitación, y/o funcionales, descritos anteriormente. La guía con respecto a la valoración cuantitativa de los anticuerpos que reducen
10 consistentemente de manera significativa la unión del VEGF al VEGFR2 y que no inhiben consistentemente de manera significativa la unión del VEGF al VEGFR1 es como se ha descrito anteriormente.

En el presente documento se muestra que r84 reduce la cantidad de VEGF que se une a los pocillos del análisis de ELISA recubiertos con VEGFR2 a aproximadamente 11 % y 2 %, respectivamente, con excesos molares de 100
15 veces y 500 veces frente al VEGF. Estas cifras son iguales a las reducciones de la unión del VEGF al VEGFR2 de aproximadamente 89 % y aproximadamente 98 %, respectivamente. En el presente documento se muestra que r84 mantiene la cantidad de VEGF que se une a pocillos de ELISA recubiertos con VEGFR1 a aproximadamente 94 % y 84 %, respectivamente, con excesos molares de 100 veces y 500 frente al VEGF. Incluso con un exceso molar de 1000 veces frente al VEGF, r84 mantiene todavía la unión del VEGF a VEGFR1 a aproximadamente 65 %. Se
20 entenderá de nuevo que los anticuerpos que inhiben de manera más sustancial la unión del VEGF al VEGFR2 pueden tolerar probablemente más reducción de la unión a VEGFR1. Igualmente, cuando un anticuerpo tiene una reducción moderada de la unión del VEGF al VEGFR2, se debe perseguir más estrictamente el mantenimiento de la unión a VEGFR1. Así, se apreciará que una diferencia "comparativa" entre los dos valores es importante.

25 Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos humanos de la presente invención como se define en el presente documento o partes o fragmentos de los mismos, o las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas a las mismas, forman aspectos también adicionales de la invención. Las moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21 (que es codificada preferiblemente por la SEQ ID NO: 20). Otras
30 moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden secuencias que codifican una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (que es codificada preferiblemente por la SEQ ID NO: 22) y que codifican una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (que es codificada preferiblemente por la SEQ ID NO: 23).

35 Otras moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden secuencias que codifican formas de IgG de los anticuerpos de la invención o formas quiméricas murinas, por ejemplo, las descritas en el ejemplo 6.

Como se ha indicado antes, otras moléculas de ácido nucleico abarcadas por la presente invención son aquellas que codifican partes o fragmentos de los anticuerpos humanos de la presente invención, por ejemplo, las que codifican
40 una cadena pesada de un anticuerpo (p. ej., las que codifican la SEQ ID NO: 24, tal como la SEQ ID NO: 22) o las que codifican una cadena ligera de un anticuerpo (p. ej., las que codifican la SEQ ID NO: 25, tal como la SEQ ID NO: 23). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son aquellas que codifican una región VH de un anticuerpo de la presente invención (p. ej., las que codifican la SEQ ID NO: 3, tal como la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 26). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son las que codifican una región VL de un anticuerpo de la presente
45 invención (p. ej., las que codifican la SEQ ID NO: 4, tal como la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 27).

Por lo tanto, los fragmentos de los anticuerpos de la invención como se definen en el presente documento, o secuencias sustancialmente homólogas a los mismos, o moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias que codifican dichos fragmentos forman un aspecto también adicional de la invención.

50 De manera ventajosa, los anticuerpos de la presente invención, cuando están en el formato de IgG, tienen una alta afinidad de unión para el VEGF, es decir, tienen una K_d en el intervalo de 1×10^{-8} M o menos. Hay que destacar que los anticuerpos con dicha afinidad están en el intervalo establecido que se ha mostrado que es útil para terapia. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención, cuando están en el formato de IgG, tienen una afinidad de unión
55 para el VEGF (preferiblemente VEGF humano) que corresponde a una K_d menor de 20 nM, 15 nM o 10 nM, más preferiblemente menor de 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1 nM. Por ejemplo, la afinidad de unión de los anticuerpos de la invención, cuando están en el formato de IgG, puede ser $6,7 \times 10^{-9}$ M o menos, tal como ser aproximadamente 7×10^{-9} M o aproximadamente 6×10^{-9} M o ser $6,7 \times 10^{-9}$ M. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para determinar la K_d . Sin embargo, preferiblemente la K_d se determina

ensayando diferentes concentraciones del anticuerpo de ensayo contra diferentes concentraciones del antígeno (VEGF) in vitro para establecer una curva de saturación, por ejemplo usando el procedimiento de Lineweaver-Burk, o preferiblemente, usando un software de modelo de unión disponible en el comercio, tal como el modelo de unión 1:1 en el software de Evaluación Biacore 3000. En el ejemplo 5 se describe un ensayo adecuado con fines ilustrativos.

- 5 Preferiblemente, la K_d se determina inmovilizando el antígeno (VEGF) en un soporte sólido, p. ej., un chip Biacore, y evaluando la unión del anticuerpo al antígeno. Preferiblemente, la afinidad de unión evalúa a temperatura ambiente, p. ej., a una temperatura de 25°C, aunque también se puede evaluar a otras temperaturas, p. ej., 37°C (por ejemplo, temperatura corporal).
- 10 Como se describe en otra parte en el presente documento, los anticuerpos preferidos de la invención se unen tanto al VEGF humano como al VEGF murino. Ésta es una ventaja importante para permitir la traducción más eficaz desde estudios preclínicos al uso clínico. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse tanto al VEGF humano como al VEGF murino significa que estos anticuerpos se pueden ensayar en estudios preclínicos usando modelos tumorales tanto singénicos como de xenoinjerto. Los anticuerpos que no se unen al
- 15 VEGF de ratón no se pueden usar en modelos singénicos de ratón.

Además, la capacidad para unirse tanto al VEGF humano como de ratón, significa que los resultados mostrados por dichos anticuerpos de la invención en los modelos de xenoinjerto de ratón es más probable que sean representativos de la actividad de los anticuerpos en sujetos humanos. La razón para esto es que los anticuerpos

20 que pueden unirse al VEGF humano pero no al VEGF de ratón (p. ej., Avastin y 2C3) se unirán al VEGF producido por las células tumorales humanas en el modelo de ratón pero no serán capaces de unirse al VEGF murino endógeno. Por supuesto, esto es diferente de la situación en un paciente humano, en el cual estarán presentes el VEGF producido por el tumor y el VEGF endógeno.

- 25 La desventaja potencial con dicha situación es que un anticuerpo que se una al VEGF humano pero no al VEGF de ratón puede funcionar bien en un modelo de xenoinjerto de ratón pero esto puede no reflejarse en un funcionamiento similar en un sistema humano donde hay mucho más VEGF presente. En otras palabras, el efecto antitumoral visto en un sistema de xenoinjerto de ratón con un anticuerpo que puede unirse al VEGF humano pero no al VEGF de ratón puede verse mejor que la realidad clínica. En cambio, si se está trabajando con un anticuerpo que puede
- 30 unirse tanto al VEGF humano como de ratón, entonces éste se unirá a todas las formas de VEGF presentes en el sistema de modelo de ratón y es probable que sea más representativo de la situación cuando el anticuerpo se pone en seres humanos.

- En las siguientes descripciones de las composiciones, inmunconjugados, productos farmacéuticos, combinaciones, cócteles, kits, primeros y segundos usos médicos y todos los procedimientos de acuerdo con esta invención, los
- 35 términos “anticuerpo” e “inmunconjugado”, o una región de unión al antígeno o fragmento de los mismos, a menos que se exponga específicamente lo contrario o se esté claro por la terminología científica, se refiere a una variedad de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, así como a los anticuerpos r84 específicos.

- 40 Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina”, como se usan en el presente documento, se refieren ampliamente a cualquier agente o molécula de unión inmunológica que comprende un dominio humano de unión al antígeno, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos enteros se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias
- 45 de éstas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

- 50 En general, cuando en la invención se usan anticuerpos enteros en lugar de regiones de unión al antígeno, se prefieren la IgG y/o IgM porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se producen más fácilmente en un laboratorio.

- Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos mamíferos se asignan a uno de dos tipos claramente distintos: kappa (κ) y
- 55 lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes y algunos aminoácidos en las regiones armazón de sus dominios variables. Esencialmente no hay preferencia por el uso de las regiones constantes de cadena ligera κ o λ en los anticuerpos de la presente invención.

Como entenderán expertos en la materia, los reactivos de unión inmunológica abarcados por el término “anticuerpo”

se extienden a todos los anticuerpos humanos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos enteros, anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y transformados por ingeniería genética, y fragmentos de los mismos.

- 5 El término “anticuerpo” se usa por lo tanto para referirse a cualquier molécula tipo anticuerpo humano que tenga una región de unión al antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión al antígeno tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DAB), dímero de TandAb, Fv, scFv (Fv de cadena simple), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minianticuerpos, fragmentos bivalentes, fragmentos biespecíficos de anticuerpo y similares.
- 10 Las técnicas para preparar y usar varias construcciones y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la materia (véase Kabat y col., 1991). Los fragmentos bivalentes, en particular, se describen adicionalmente en los documentos EP 404.097 y WO 93/11161; mientras que los anticuerpos lineales se describen adicionalmente en Zapata y col. (1995).
- 15 Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')₂ al tratar el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minianticuerpos, fragmentos bivalentes, fragmentos biespecíficos de anticuerpo y otros fragmentos también se pueden sintetizar por técnicas recombinantes o se pueden sintetizar químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpos son bien conocidas y están descritas en la materia. Por ejemplo, cada uno de Beckman y col., 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall y col., 2004; Reff y Heard, 2001; Reiter y col., 1996; y Young y col., 1995 describe adicionalmente y permite la producción de fragmentos de anticuerpos efectivos.
- 20 Los anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos se pueden producir de manera natural o se pueden producir completa o parcialmente de forma sintética. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, fuentes recombinantes y/o producir en animales transgénicos o plantas transgénicas, o en huevos usando tecnología de IgY. Por lo tanto, las moléculas de anticuerpo se pueden producir in vitro o in vivo.
- 25 El anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo que comprende tres dominios de CDR y una región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo que comprende tres dominios de CDR. Dichas VL y VH forman en general el sitio de unión al antígeno.
- 30 Un fragmento “Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región tiene un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero de V_H-V_L. De manera colectiva, las seis regiones hipervariables (CDR) confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo.
- 35 Sin embargo, está bien documentado en la técnica que la presencia de tres CDR del dominio variable de cadena ligera y tres CDR del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo no es necesaria para la unión al antígeno. Por lo tanto, se sabe que construcciones más pequeñas que el fragmento clásico de anticuerpo anterior son eficaces.
- 40 Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos (Hamers-Casterman y col., 1993; Arbabi Ghahroudi y col., 1997) tienen un extenso repertorio de unión al antígeno pero están desprovistos de cadenas ligeras. También, los resultados con anticuerpos de dominio único que comprenden solo dominios VH (Ward y col., 1989; Davies y Riechmann, 1995) o solo dominios VL (van den Beucken y col., 2001) muestran que estos dominios pueden unirse al antígeno con afinidades aceptablemente altas. De esta manera, tres CDR se pueden unir eficazmente al antígeno.
- 45 También se sabe que una sola CDR, o dos CDR, pueden unirse eficazmente al antígeno. Como un primer ejemplo, se puede insertar una sola CDR en una proteína heteróloga y conferir capacidad de unión al antígeno en la proteína heteróloga, como se ilustra mostrando que la región CDR3 de VH insertada en una proteína heteróloga, tal como GFP, confiere capacidad de unión al antígeno en la proteína heteróloga (Kiss y col., 2006; Nicaise y col., 2004).
- 50

Además, se sabe que dos CDR pueden unirse eficazmente al antígeno, y conferir incluso propiedades superiores que las que tiene el anticuerpo de origen. Por ejemplo, se ha mostrado (Qiu y col., 2007) que dos CDR de un anticuerpo original (una región CDR1 de VH y CDR3 de VL) retienen las propiedades de reconocimiento de antígeno

de la molécula original pero tiene una capacidad superior para penetrar en tumores. La unión de estos dominios con una secuencia ligadora adecuada (p. ej., de FR2 de VH) para orientar las CDR de una manera que se parezca al anticuerpo original natural, produjo incluso mejor reconocimiento de antígeno. Por lo tanto, se sabe en la técnica que se pueden construir miméticos de anticuerpos de unión al antígeno que comprenden dos dominios de CDR (preferiblemente uno de un dominio VH y uno de un dominio VL, lo más preferiblemente, siendo uno de los dos dominios de CDR un dominio de CDR3) orientados por medio de una región armazón adecuada para mantener la conformación encontrada en el anticuerpo original.

Los anticuerpos de la invención comprenden seis regiones CDR (tres de una cadena ligera y tres de una cadena pesada). Se describen en la presente memoria anticuerpos con menos de seis regiones CDR y con tan pocas como una o dos regiones CDR. Además, también se describen anticuerpos con CDR sólo de la cadena pesada o cadena ligera.

Los anticuerpos de la invención que se unen al VEGF comprenden al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(a) una CDR1 de región ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(b) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(c) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Las regiones CDR de cadena pesada para usar junto con las regiones CDR de cadena ligera especificadas, se describen en otra parte del presente documento. Sin embargo, también se describen en el presente documento otras regiones variables de cadena pesada que comprenden tres CDR para usar junto con las regiones variables de cadena ligera de la invención. Las regiones variables de cadena pesada adecuadas, que se pueden usar en combinación con las regiones variables de cadena ligera de la invención y que dan lugar a un anticuerpo que se une al VEGF las puede identificar fácilmente un experto en la materia.

Por ejemplo, una región variable de cadena ligera de la invención se puede combinar con una región variable de cadena pesada individual o un repertorio de regiones variables de cadena pesada y ensayar en los anticuerpos resultantes la unión al VEGF. Se esperaría que un número razonable de estas combinaciones de regiones variables de cadena ligera de la invención con diferentes regiones variables de cadena pesada retuviera la capacidad para unirse al VEGF. En realidad, esto se ha demostrado con el anticuerpo preferido de la invención (r84/PGN311) donde se ha mostrado que el dominio VL de este anticuerpo se puede combinar con varios dominios VH diferentes y retener todavía la capacidad para unirse al VEGF. En estos experimentos, 3 de 7 dominios VH que se ensayaron en combinación con el dominio VL del anticuerpo r84, mostraron unión significativa al VEGF, que es una proporción muy razonable y se pone de manifiesto que la región variable de cadena ligera de los anticuerpos de la invención es en particular importante en la determinación de la especificidad de unión al VEGF y también que se pueden identificar fácilmente otras regiones variables de cadena pesada que se pueden combinar con las regiones variables de cadena ligera de la invención y que dan lugar a los anticuerpos que se unen al VEGF. Las regiones variables de cadena pesada preferidas para usar en combinación con las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos de la invención son las obtenidas o derivadas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se sabe que se unen al VEGF.

Se pueden usar procedimientos similares para identificar regiones variables de cadena ligera alternativas, para usar en combinación con regiones variables de cadena pesada preferidas de la invención.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende toda o una parte de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1, o una parte de la misma. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender toda o una parte de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, o una parte de la misma. Todas o parte de dichas regiones constantes se pueden producir de manera natural o pueden ser completa o parcialmente sintéticas. Las secuencias adecuadas para dichas regiones constantes son bien conocidas y están

bien documentadas en la técnica. Cuando se incluyen en los anticuerpos de la invención un complemento completo de regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, estos anticuerpos se denominan típicamente en el presente documento anticuerpos “de longitud completa” o anticuerpos “enteros”.

- 5 Los anticuerpos que contienen una región Fc se prefieren para ciertos usos, en particular usos terapéuticos in vivo, donde la región Fc media las funciones efectoras tal como ADCC y CDC.

La expresión “sustancialmente homólogo” como se usa en el presente documento en relación con una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico incluye secuencias que tienen al menos 70 % o 75 %, preferiblemente al menos 80
10 %, e incluso más preferiblemente al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia descrita de aminoácidos o de ácido nucleico. Las secuencias sustancialmente homólogas de la invención incluyen, por lo tanto, una o múltiples alteraciones de bases o aminoácidos (adiciones, sustituciones, inserciones o eliminaciones) respecto a las secuencias de la invención. Al nivel de aminoácidos, las secuencias sustancialmente homólogas contienen sólo 1, 2 o 3, preferiblemente 1 o 2, aminoácidos alterados, en una o más de
15 las CDR que componen las secuencias de la invención. Al nivel de aminoácidos, las secuencias sustancialmente homólogas preferidas contienen sólo 1, 2, 3, 4 o 5, preferiblemente 1, 2 o 3, más preferiblemente 1 o 2, aminoácidos alterados, en una o más de las regiones armazón que componen las secuencias de la invención. Dichas alteraciones pueden ser con aminoácidos conservados o no conservados. Preferiblemente, estas alteraciones son sustituciones de aminoácidos conservadoras.

20 Las secuencias de ácido nucleico sustancialmente homólogas también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan con las secuencias de ácido nucleico descritas (o sus secuencias complementarias), por ejemplo, hibridan con secuencias de nucleótidos que codifican una o más de las CDR de cadena ligera o cadena pesada de la invención, las regiones variables de cadena ligera o pesada de la invención, o los anticuerpos de la invención (o
25 hibridan con sus secuencias complementarias), al menos en condiciones de hibridación moderadamente restrictivas.

La expresión “sustancialmente homólogo” también incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la presente invención que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo,
30 cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo (o el ácido nucleico sustancialmente homólogo que lo codifica) debe retener la capacidad para unirse al VEGF como se ha descrito antes. Preferiblemente, cualquier proteína de unión sustancialmente homóloga debe retener la capacidad para unirse de manera específica al mismo epítipo del VEGF reconocido por la proteína de unión en cuestión, por ejemplo, el mismo epítipo reconocido por los dominios de CDR de la invención o los dominios VH o VL de la invención como se describe en el presente documento. La unión al
35 mismo epítipo/antígeno se puede ensayar fácilmente por procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica, p. ej., usando ensayos de unión, p. ej., un ensayo de competición.

Por lo tanto, un experto en la materia apreciará que se pueden usar ensayos de unión para ensayar si los anticuerpos “sustancialmente homólogos” tienen las mismas especificidades de unión que los anticuerpos y
40 fragmentos de anticuerpo de la invención, por ejemplo, se pueden usar fácilmente ensayos de unión tal como ensayos de ELISA o ensayos de Biacore para establecer si estos anticuerpos “sustancialmente homólogos” pueden unirse al VEGF. Como se resume más adelante, se puede usar un ensayo de unión de competición para ensayar si los anticuerpos “sustancialmente homólogos” retienen la capacidad para unirse de manera específica a sustancialmente el mismo epítipo del VEGF reconocido por los anticuerpos de la invención. El procedimiento
45 descrito más adelante es sólo un ejemplo de un ensayo adecuado de competición. La persona experta será consciente de otros procedimientos y variaciones adecuadas.

Un ensayo de competición de ejemplo comprende evaluar la unión de varias concentraciones eficaces de un anticuerpo de la invención al VEGF en presencia de concentraciones variables de un anticuerpo de ensayo (p. ej.,
50 un anticuerpo sustancialmente homólogo). Después se puede evaluar la cantidad de inhibición de la unión inducida por el anticuerpo de ensayo. Un anticuerpo de ensayo que muestra mayor competición con un anticuerpo de la invención en concentraciones crecientes (es decir, concentraciones crecientes del anticuerpo de ensayo dan como resultado una reducción correspondiente de la cantidad del anticuerpo de la invención que se une al VEGF) es prueba de la unión a sustancialmente el mismo epítipo. Preferiblemente, el anticuerpo de ensayo reduce
55 significativamente la cantidad de anticuerpo de la invención que se une al VEGF. Preferiblemente, el anticuerpo de ensayo reduce la cantidad de anticuerpo de la invención que se une al VEGF por al menos aproximadamente 80 %. Los ensayos ELISA son adecuados para evaluar la inhibición de la unión en este ensayo de competición, pero el experto en la materia conocerá otras técnicas adecuadas.

Las secuencias sustancialmente homólogas de proteínas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácidos conservadoras, o por ejemplo, alteraciones que no afectan los dominios VH, VL o de CDR de los anticuerpos, p. ej., incluyen anticuerpos de scFv donde se usa una secuencia ligadora diferente o anticuerpos donde se añaden secuencias de marcadores u otros componentes que no contribuyen a la unión del antígeno, o alteraciones para convertir un tipo o formato de molécula o fragmento de anticuerpo en otro tipo o formato de molécula o fragmento de anticuerpo (p. ej., conversión de Fab en scFv o viceversa), o la conversión de una molécula de anticuerpo en una clase o subclase particular de molécula de anticuerpo (p. ej., la conversión de una molécula de anticuerpo en IgG o una subclase de la misma, por ejemplo, IgG1 o IgG3).

- 10 Una "sustitución de aminoácido conservadora", como se usa en el presente documento, es una en la cual el resto de aminoácido se reemplaza por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., glicina, cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

- La homología se puede evaluar por cualquier procedimiento conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de homología entre secuencias, son útiles programas de ordenador que hacen múltiples alineamientos de secuencias, por ejemplo, Clustal W (Thompson y col., 1994). Si se desea, se puede usar el algoritmo de Clustal W junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, 1992) y una penalización de apertura de hueco de 10 y penalización de extensión de hueco de 0,1, de modo que se obtenga la correspondencia de mayor orden entre las dos secuencias, en donde al menos 50 % de la longitud total de una de las secuencias está implicada en el alineamiento. Otros procedimientos que se pueden usar para alinear secuencias son el procedimiento de alineamiento de Needleman y Wunsch (1970), revisado por Smith y Waterman (1981) de modo que se obtenga la correspondencia de mayor orden entre las dos secuencias y se determine el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Otros procedimientos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos en general son reconocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos descritos por Carillo y Lipton (1988) y los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects.

- En general, se usarán programas de ordenador para estos cálculos. Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, como ALIGN (Myers y Miller, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, 1988; Pearson, 1990) y BLAST con huecos (Altschul y col., 1997), BLASTP, BLASTN, o GCG (Devereux y col., 1984) son también útiles para este propósito. Además, el servidor Dali en el Instituto europeo de bioinformática ofrece alineaciones basadas en estructura de secuencias de proteínas (Holm, 1993; 1995; 1998).

- Para proporcionar un punto de referencia, se pueden determinar secuencias de acuerdo a la presente invención que tienen 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología, o de identidad de secuencia, etc., usando el programa ALIGN con parámetros por defecto, (disponible, por ejemplo, en internet en el servidor de red de GENESTREAM, IGH, Montpellier, Francia).

- Por "condiciones de hibridación al menos moderadamente restrictivas" se entiende que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. La hibridación puede ocurrir en toda o una parte de una molécula de la secuencia de ácido nucleico. La parte que hibrida típicamente es de al menos 15 (p. ej., 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia reconocerán que se determina la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, por la T_m , que en tampones que contienen sodio es una función de la concentración del ion sodio y la temperatura ($T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+] + 0,41 (\%(\text{G}+\text{C}) - 600/1))$, o ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad híbrida son la concentración de iones sodio y la temperatura. Con el fin de identificar moléculas que son similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida, se puede asumir un apareamiento erróneo de 1 % para dar como resultado una disminución de aproximadamente 1°C en la T_m . Por ejemplo, si se buscan moléculas de ácido nucleico que tengan una identidad $>95\%$, la temperatura final de lavado se reducirá en aproximadamente 5°C . Basándose en estas consideraciones, los expertos en la materia serán capaces de seleccionar fácilmente condiciones de hibridación adecuadas. En realizaciones preferidas, se seleccionan condiciones restrictivas de hibridación. A modo de ejemplo, se pueden usar las siguientes condiciones para lograr hibridación restrictiva: hibridación con 5x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/5x solución de Denhardt/1,0 % de SDS a T_m de -5°C basándose en la ecuación anterior, seguido por un lavado de 0,2x SSC/0,1 %

de SDS a 60°C. Las condiciones de hibridación moderadamente restrictivas incluyen una etapa de lavado en 3x SSC a 42°C. A modo de ejemplo adicional, las secuencias que “hibridan” son aquellas secuencias que se unen (hibridan) en condiciones no restrictivas (p. ej., 6 x SSC, 50 % de formamida a temperatura ambiente) y se lavan en condiciones de baja restricción (p. ej., 2 x SSC, temperatura ambiente, más preferiblemente 2 x SSC, 42°C) o condiciones de restricción más alta (p. ej., 2 x SSC, 65°C) (donde SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,2).

Sin embargo, se entiende que se pueden lograr restricciones equivalentes usando tampones, sales y temperaturas alternativas. Se puede encontrar guía adicional con respecto a las condiciones de hibridación en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6, y en: Sambrook y col., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3.

Hablando en general, se prefieren secuencias que hibridan en condiciones de alta restricción, puesto que son secuencias que, salvo por la degeneración del código genético, hibridarán en condiciones de restricción alta.

En otras realizaciones preferidas, se proporcionan anticuerpos de segunda generación que tienen propiedades mejoradas o superiores en comparación con un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, original tal como r84. Por ejemplo, los anticuerpos de segunda generación pueden tener una mayor afinidad de unión, bloqueando más eficazmente la unión del VEGF al VEGFR2, bloqueando de manera más específica la unión del VEGF al VEGFR2, incluso bloqueando menos la unión del VEGF al VEGFR1, capacidad mejorada para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por el VEGF, capacidad superior para inhibir la permeabilidad vascular inducida por el VEGF, y preferiblemente, una capacidad mayor para inhibir la angiogénesis inducida por el VEGF in vivo, y para tratar enfermedades angiogénicas, incluyendo tumores vascularizados.

Se llevan a cabo y se cuantifican fácilmente comparaciones para identificar anticuerpos de segunda generación eficaces, p. ej., usando uno o más de los diferentes ensayos descritos en detalle en el presente documento. Los anticuerpos de segunda generación que tienen una propiedad o actividad biológica mejorada de al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, y preferiblemente, al menos aproximadamente 50 veces, en comparación con los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención, como se ilustra por el anticuerpo r84, están abarcados por la presente invención.

El anticuerpo, proteína de unión y moléculas de ácido nucleico de la invención en general son moléculas “aisladas” o “purificadas” en cuanto a que se distinguen de cualquier componente que puede estar presente in situ dentro de un cuerpo animal o humano o una muestra de tejido derivada de un cuerpo animal o humano. Sin embargo, las secuencias pueden corresponder a o ser sustancialmente homólogas a las secuencias encontradas en el cuerpo humano o animal. Por lo tanto, el término “aislada” o “purificada” como se usa en el presente documento en referencia a las moléculas o secuencias de ácido nucleico y proteínas o polipéptidos, p. ej., anticuerpos, se refiere a dichas moléculas cuando se aíslan de, se purifican de, o carecen sustancialmente de su entorno natural, por ejemplo, aisladas de o purificadas del cuerpo humano o animal (si realmente se presentan de manera natural), o se refiere a dichas moléculas cuando se producen por un procedimiento técnico, es decir, incluye moléculas recombinantes y producidas de manera sintética.

Por lo tanto, cuando se usa en relación con una molécula de ácido nucleico, estos términos pueden referirse a un ácido nucleico sustancialmente exento de material con el cual está naturalmente asociado tal como otros ácidos nucleicos/genes o polipéptidos. Estos términos también pueden referirse a un ácido nucleico sustancialmente exento de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o sustancialmente exento de precursores químicos, u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Un ácido nucleico aislado o purificado también puede estar sustancialmente exento de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del cual se obtiene el ácido nucleico o secuencias que se han hecho para flanquear el ácido nucleico (p. ej., secuencias de marcadores u otras secuencias que no tienen valor terapéutico) por ejemplo por ingeniería genética.

Por lo tanto, cuando se usa en relación con una molécula de proteína o polipéptido tal como CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera, CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada, regiones variables de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada, y proteínas de unión o anticuerpos de la invención, incluyendo anticuerpos de longitud completa, el término “aislada” o “purificada” se refiere típicamente a una proteína sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas de la fuente de la cual se obtiene. En algunas realizaciones, en particular cuando la proteína se va a administrar a seres humanos o animales, dichas proteínas aisladas o purificadas están sustancialmente exentas de medio de cultivo cuando se producen por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se

sintetizan químicamente. Dichas proteínas aisladas o purificadas también pueden estar exentas de secuencias flanqueadoras tales como las descritas anteriormente para las moléculas de ácido nucleico aisladas.

La expresión “secuencia de ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósidos o de nucleótidos compuestos de bases que se presentan de manera natural, azúcares y uniones entre azúcares (cadena principal). La expresión también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros que no se presentan de manera natural, o partes de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases que se presentan de manera natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Los ejemplos de dichas bases modificadas incluyen aza y desaza-adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser bicatenarias o monocatenarias. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser completamente o parcialmente sintéticas o recombinantes.

El término “humano” como se usa en el presente documento en relación con moléculas de anticuerpo y proteínas de unión se refiere primero a anticuerpos y proteínas de unión que tienen regiones variables (p. ej., regiones V_H, V_L, CDR o FR) y opcionalmente, regiones constantes de anticuerpo, aisladas o derivadas de un repertorio humano o derivadas de o que corresponden a las secuencias encontradas en seres humanos, p. ej., en la línea germinal o células somáticas humanas. El anticuerpo r84 es un ejemplo de dicha molécula de anticuerpo humano en donde se han aislado las regiones variables de un repertorio humano.

Los anticuerpos “humanos” de la invención y las proteínas de unión descritas en el presente documento incluyen además restos de aminoácido no codificados por secuencias humanas, p. ej., mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio in vitro, por ejemplo mutaciones introducidas por clonación in vitro o PCR. Los ejemplos particulares de dichas mutaciones son mutaciones que implican sustituciones conservadoras u otras mutaciones en un pequeño número de restos del anticuerpo o proteína de unión, por ejemplo, en 5, 4, 3, 2 o 1 de los restos del anticuerpo o proteína de unión, preferiblemente, p. ej., en 3, 2 o 1 de los restos que componen una o más de las CDR del anticuerpo o proteína de unión. Algunos ejemplos de dichos anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos y regiones variables que se han sometido a técnicas de modificación estándar para reducir la cantidad de sitios potencialmente inmunógenos.

Por lo tanto, los anticuerpos “humanos” de la invención incluyen secuencias derivadas de y relacionadas con las secuencias encontradas en seres humanos, pero que no pueden existir de manera natural dentro del repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos, in vivo. Además, los anticuerpos humanos y proteínas de unión de la presente invención incluyen proteínas que comprenden secuencias de consenso humanas identificadas a partir de secuencias humanas, o secuencias sustancialmente homólogas a secuencias humanas.

Además, los anticuerpos humanos y proteínas de unión de la presente invención no se limitan a combinaciones de las regiones V_H, V_L, CDR o FR que se encuentran por sí mismas en combinación en moléculas de anticuerpos humanos. Por lo tanto, los anticuerpos humanos y proteínas de unión de la invención pueden incluir o corresponder a combinaciones de dichas regiones que no existan necesariamente de manera natural en seres humanos.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos humanos serán anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos “completamente humanos”, como se usa en el presente documento, son anticuerpos que comprenden dominios de región variable y/o CDR “humanos”, como se ha definido antes, sustancialmente sin secuencias de anticuerpo no humanas o sin ninguna secuencia de anticuerpo no humana. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden dominios de región variable y/o CDR humanos, “sustancialmente sin secuencias de anticuerpo no humanas” son anticuerpos y/o dominios en los cuales sólo aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos son aminoácidos que no son codificados por secuencias de anticuerpo humanas y/o CDR en las que solo 3, 2 o 1 aminoácidos son aminoácidos que no son codificados por secuencias de anticuerpo humanas. Por lo tanto, los anticuerpos “completamente humanos” se distinguen de los anticuerpos “humanizados”, que se basan en dominios de región variable sustancialmente no humanos, por ejemplo, dominios de región variable de ratón, en los cuales se han cambiado algunos aminoácidos para corresponder mejor con los aminoácidos típicamente presentes en los anticuerpos humanos.

Los anticuerpos “completamente humanos” de la invención pueden ser dominios de región variable y/o CDR humanos, sustancialmente sin ninguna otra secuencia de anticuerpo, tal como ser anticuerpos monocatenarios. Alternativamente, los anticuerpos “completamente humanos” de la invención pueden ser dominios de región variable

y/o CDR humanos, integrales con o unidos operativamente a una o más regiones constantes de anticuerpo humano. Ciertos anticuerpos completamente humanos preferidos son anticuerpos tipo IgG con el complemento completo de regiones constantes de IgG.

- 5 En otras realizaciones, los anticuerpos “humanos” de la invención serán anticuerpos quiméricos humanos en parte. Los anticuerpos “quiméricos humanos en parte”, como se usan en el presente documento, son anticuerpos que comprenden dominios de región variable y/o CDR “humanos” operativamente unidos a, o injertados en, una región constante de una especie no humana, tal como rata o ratón. Dichos anticuerpos quiméricos en parte humanos se pueden usar, por ejemplo, en estudios preclínicos, en donde la región constante preferiblemente será de la misma especie de animal usada en el ensayo preclínico. Estos anticuerpos quiméricos humanos en parte también se pueden usar, por ejemplo, en diagnósticos ex vivo, en donde la región constante de la especie no humana puede proporcionar opciones adicionales para la detección de anticuerpos.

- 15 El término “fragmento” como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos de relevancia biológica, p. ej., fragmentos que contribuyen a la unión al antígeno, p. ej., forman parte del sitio de unión al antígeno, y/o contribuyen a la inhibición o reducción de la función del antígeno de VEGF y/o contribuyen a prevenir que el antígeno del VEGF interactúe con el ligando natural, VEGFR2. Algunos fragmentos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada (dominio V_H) y una región variable de cadena ligera (dominio V_L) de los anticuerpos de la invención. Otros fragmentos descritos en el presente documento comprenden una o más de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos de la invención (o de los dominios V_H de la invención), o una o más de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos de la invención (o de los dominios V_L de la invención). Algunos fragmentos descritos en el presente documento son de al menos 5 aminoácidos de longitud y comprenden al menos una región CDR, preferiblemente una región CDR3, más preferiblemente una región CDR3 de cadena pesada.

- 25 En las realizaciones donde los anticuerpos de la invención comprenden un fragmento de cualquiera de las secuencias definidas (por ejemplo, comprenden un fragmento de SEQ ID NO: 21, p. ej., son anticuerpos que comprenden dominios V_H y/o V_L de la invención, o comprenden las CDR de la invención, entonces estas regiones/dominios en general se separan dentro del anticuerpo o proteína de unión de modo que cada región/dominio puede realizar su función biológica y de modo que se retenga la contribución a la unión al antígeno. Por lo tanto, los dominios V_H y V_L se separan preferiblemente por secuencias armazón/secuencias ligadoras adecuadas y las CDR se separan preferiblemente por regiones armazón adecuadas tales como las encontradas en los anticuerpos que se presentan de manera natural y/o anticuerpos transformados por ingeniería genética eficaces. Por lo tanto, las secuencias de V_H , V_L y CDR, individuales de la invención se proporcionan preferiblemente dentro de, o se incorporan en, una región armazón o región bastidor adecuada para permitir la unión al antígeno. Estas secuencias o regiones armazón pueden corresponder a regiones armazón que se presentan de manera natural, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, según sea adecuado, para formar un bastidor adecuado, o pueden corresponder a regiones armazón de consenso, por ejemplo, identificadas al comparar varias regiones armazón que se presentan de manera natural. Alternativamente, se pueden usar regiones bastidor o armazón que no son de anticuerpo, por ejemplo, regiones armazón del receptor de linfocitos T.

- 40 Las secuencias adecuadas que se pueden usar para las regiones armazón son bien conocidas y están documentadas en la técnica y se puede usar cualquiera de éstas. Las secuencias preferidas para las regiones armazón son una o más de las regiones armazón que componen los dominios V_H y/o V_L de la invención, es decir, una o más de las regiones armazón descritas en la SEQ ID NO: 21 o en la Tabla 1, o regiones armazón sustancialmente homólogas a las mismas, y en particular regiones armazón que permiten el mantenimiento de la especificidad de antígeno, por ejemplo regiones armazón que dan como resultado sustancialmente la misma o la misma estructura 3D del anticuerpo. En algunas realizaciones preferidas, las cuatro cadenas ligeras variables (SEQ ID NO: 15, 16, 17 y 18) y/o cadenas pesadas variables (SEQ ID NO: 11, 12, 13 y 14), según sea adecuado, regiones FR de SEQ ID NO: 21 (también mostradas en la Tabla 1), o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

- Los anticuerpos de la invención están compuestos por V_H , V_L o CDR de la invención. Otros anticuerpos descritos en el presente documento también abarcan una o más de V_H , V_L o CDR de la invención en combinación con otras V_H , V_L o CDR que no son de la invención, con la condición que las propiedades de unión al VEGF de los anticuerpos o las proteínas de unión de la invención como se ha resumido antes, estén todavía presentes.

El término “región determinante de complementariedad de cadena pesada” (“CDR de cadena pesada”) como se usa en el presente documento se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena pesada (dominio V_H) de una molécula de anticuerpo. La región variable de cadena pesada tiene tres CDR llamadas CDR1

de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada y CDR3 de cadena pesada, del extremo amino al extremo carboxi. La región variable de cadena pesada tiene también cuatro regiones armazón (FR1, FR2, FR3 y FR4 del extremo amino al extremo carboxi). Estas regiones armazón separan las CDR.

- 5 La expresión “región variable de cadena pesada” (dominio V_H) como se usa en el presente documento se refiere a la región variable de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo.

La expresión “región determinante de complementariedad de cadena ligera” (“CDR de cadena ligera”) como se usa en el presente documento se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena ligera
 10 (dominio V_L) de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de cadena ligera tienen tres CDR llamadas CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera del extremo amino al extremo carboxi. La región variable de cadena ligera también tiene cuatro regiones armazón (FR1, FR2, FR3 y FR4 del extremo amino al extremo carboxi). Estas regiones armazón separan las CDR.

- 15 La expresión “región variable de cadena ligera” (dominio V_L) como se usa en el presente documento se refiere a la región variable de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

Se debe indicar que en el presente documento se sigue la nomenclatura Kabat, donde es necesario, con el fin de definir la posición de las CDR (Kabat y col., 1991).

20 Una persona experta en la técnica apreciará que las proteínas y polipéptidos de la invención, tal como las CDR de cadena ligera y pesada, las regiones variables de cadena ligera y pesada, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoconjugados, se pueden preparar de cualquiera de varias formas bien conocidas y descritas en la técnica, pero se preparan más preferiblemente usando procedimientos recombinantes.

25 Los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la invención se pueden obtener o producir por cualquier procedimiento adecuado, p. ej., por clonación o síntesis. Por ejemplo, dichas secuencias se podrían preparar por clonación de secuencias adecuadas por ejemplo de genes de línea germinal humana y después haciendo cualquier modificación necesaria en las secuencias de línea germinal
 30 para obtener las secuencias de la invención usando procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica. Un procedimiento alternativo y más eficaz sería sintetizar la secuencia de la región variable de cadena ligera o pesada adecuada como cebadores que se superponen, y usar la extensión de cebador para obtener la secuencia completa. Esta secuencia completa después se podría amplificar mediante PCR con cebadores que contengan sitios de restricción adecuados para clonación y manipulación adicional, p. ej., para clonación en un vector de expresión
 35 adecuado. Normalmente son suficientes de 5 a 7 cebadores que se superponen por región variable, haciendo de este modo que esta técnica sea muy eficaz y precisa.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la invención, estos fragmentos se pueden manipular más por técnicas estándar de
 40 ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los fragmentos de región variable en moléculas de anticuerpo de longitud completa con dominios de región constante adecuados, o en formatos particulares de fragmentos de anticuerpo, descritos en otra parte en el presente documento, p. ej., fragmentos Fab, fragmentos scFv, etc. Típicamente, o como parte de este procedimiento de manipulación adicional, los fragmentos de ácido nucleico que codifican las moléculas de anticuerpo de la invención se incorporan en general en un vector de expresión adecuado
 45 con el fin de facilitar la producción de los anticuerpos de la invención.

Los posibles vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a cósmidos, plásmidos o virus modificados (p. ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), siempre que el vector sea compatible con la célula hospedante usada. Los vectores de expresión son “adecuados para la transformación de una célula
 50 hospedante”, lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas basándose en las células hospedantes que se van a usar para la expresión, que se unen operativamente a la molécula de ácido nucleico. Operativamente unido se pretende que signifique que el ácido nucleico se une a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

55 Por lo tanto, la invención contempla un vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Las secuencias reguladoras adecuadas se pueden obtener de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamíferos o de insecto (por ejemplo, véase las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, 1990). La selección de secuencias reguladoras adecuadas depende de la célula hospedante elegida como se describe más adelante, y el experto en la materia puede realizarlo fácilmente. Los ejemplos de dichas

5 secuencias reguladoras incluyen: un promotor y potenciador de la transcripción o secuencia de unión a ARN-polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, incluyendo una señal de inicio de traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula hospedante elegida y del vector usado, se pueden incorporar en el vector de expresión otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores, y secuencias que confieren inducibilidad de transcripción.

10 Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de las células hospedantes transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables son genes que codifican una proteína tal como neomicina e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β -galactosidasa, cloranfenicol

15 acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, o una inmunoglobulina o parte de la misma tal como la parte Fc de una inmunoglobulina preferiblemente IgG. La transcripción del gen marcador seleccionable se sigue por los cambios en la concentración de la proteína marcadora seleccionable tal como la β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador seleccionable codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos tal como resistencia a neomicina, se pueden seleccionar células transformantes con G418. Las células

20 que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán. Esto permite visualizar y evaluar la expresión de los vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación en la expresión y fenotipo. Se apreciará que se pueden introducir marcadores seleccionables en un vector separado del ácido nucleico de interés.

25 Los vectores de expresión recombinante también pueden contener genes que codifican una resto de fusión que proporciona mayor expresión de la proteína recombinante; mayor solubilidad de la proteína recombinante; y ayuda en la purificación de la proteína recombinante objetivo al actuar como un ligando en la purificación por afinidad (por ejemplo, pueden estar presentes “marcadores” adecuados para permitir la purificación y/o identificación, p. ej., marcadores His o marcadores myc). Por ejemplo, se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína

30 recombinante objetivo para permitir la separación de la proteína recombinante de la parte de fusión posteriormente a la purificación de la proteína de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.

35 Se pueden introducir vectores de expresión recombinantes en células hospedantes para producir una célula hospedante transformada. Los términos “transformada con”, “transfectada con”, “transformación” y “transfección” se pretende que abarquen la introducción de ácido nucleico (p. ej., un vector) en una célula por una de muchas técnicas posibles conocidas en la materia. La expresión “célula hospedante transformada” como se usa en el presente

40 documento se pretende que incluya también células capaces de la glicosilación que se han transformado con un vector de expresión recombinante de la invención. Se pueden transformar células procariotas con ácido nucleico, por ejemplo, por electroporación o transformación mediada con cloruro de calcio. Por ejemplo, se puede introducir ácido nucleico en células de mamífero mediante técnicas convencionales tal como coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Los

45 procedimientos adecuados para transformar y transfectar células hospedantes se pueden encontrar en Sambrook y col., 1989, y en otros textos de laboratorio.

Las células hospedantes adecuadas incluyen una amplia variedad de células hospedantes eucarióticas y células hospedantes procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células de levadura o en

50 células de mamífero. Se pueden encontrar otras células hospedantes adecuadas en Goeddel, 1990. Además, las proteínas de la invención se pueden expresar en células procariotas, tal como *Escherichia coli* (Zhang y col., 2004).

Las células hospedantes de levadura y fúngicas adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a *Saccharomyces cerevisiae*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y varias especies del género

55 *Aspergillus*. Los ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, y col., 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982), pJRY88 (Schultz y col., 1987) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los protocolos para la transformación de levaduras y hongos son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, Hinnen y col., 1978; Ito y col., 1983, y Cullen y col., 1987).

Las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, entre otras: células COS (p. ej., número en ATCC CRL 1650 o 1651), BHK (p. ej., número en ATCC CRL 6281), CHO (número en ATCC CCL 61), HeLa (p. ej., número en ATCC CCL 2), 293 (número en ATCC 1573) y NS-1. Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamífero incluyen en general un promotor (p. ej., derivado de material vírico tal como poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus del simio 40), así como otras secuencias de control de la transcripción y traducción. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B., 1987) y pMT2PC (Kaufman y col., 1987).

Dadas las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, también se pueden lograr fácilmente promotores, terminadores y procedimientos para introducir vectores de expresión de un tipo adecuado en células vegetales, aviares y de insecto. Por ejemplo, dentro de una realización, las proteínas de la invención se pueden expresar de células vegetales (véase, Sinkar y col., 1987, que revisan el uso de vectores de *Agrobacterium rhizogenes*; véase también Zambryski y col., 1984, que describen el uso de vectores de expresión para células vegetales, que incluyen, entre otros, PAPS2022, PAPS2023, y PAPS2034).

Las células de insecto adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen células y líneas celulares de las especies *Bombyx*, *Trichoplusia* o *Spodoptera*. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (células SF 9) incluyen la serie pAc (Smith y col., 1983) y la serie pVL (Luckow y Summers 1989). Se describen algunos sistemas de expresión de célula de insecto-baculovirus para la expresión de las proteínas recombinantes de la invención en el documento PCT/US/02442.

Alternativamente, las proteínas de la invención también se pueden expresar en animales transgénicos no humanos tal como ratas, conejos, oveja y cerdos (Hammer y col., 1985; Palmiter y col., 1983; Brinster y col., 1985; Palmiter y Brinster 1985, y patente de EE.UU. n° 4.736.866).

Las proteínas de la invención también se pueden preparar por síntesis química usando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tal como la síntesis en fase sólida (Merrifield (1964); Frische y col., 1996) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, 1987).

Las proteínas de fusión N-terminales o C-terminales que comprenden los anticuerpos y proteínas de la invención, conjugados con otras moléculas, tales como proteínas, se pueden preparar por fusión mediante técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen un anticuerpo o proteína de la invención fusionado con la proteína seleccionada o proteína marcadora, o proteína etiqueta como se describe en el presente documento. Los anticuerpos y proteínas de la invención también se pueden conjugar con otras proteínas por técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas se pueden acoplar usando ligadores que contienen tiol heterobifuncionales como se describe en el documento WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditiopropionato) o N-succinimidil-5-tioacetato. Los ejemplos de proteínas que se pueden usar para preparar proteínas de fusión, o conjugados, incluyen proteínas de unión celular tal como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, lipoproteína de baja densidad, glucagón, endorfinas, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína glutatión S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA), y myc truncado.

Independientemente de la manera de preparación de un primer segmento de ácido nucleico de anticuerpo dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, se pueden preparar fácilmente segmentos de ácido nucleico de anticuerpo adicionales adecuados por técnicas estándar de biología molecular. Con el fin de confirmar que cualquier segmento de ácido nucleico de anticuerpo dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, variante, mutante o de segunda generación es adecuado para usar en la presente invención, el segmento de ácido nucleico se ensayará para confirmar la expresión de un anticuerpo dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el segmento de ácido nucleico variante, mutante o de segunda generación, también se ensayará para confirmar la hibridación en condiciones de hibridación estándar, más preferiblemente restrictivas estándar. Las condiciones de hibridación adecuadas, de ejemplo, incluyen hibridación en dodecil-sulfato de sodio aproximadamente al 7 % (SDS), NaPO₄ aproximadamente 0,5 M, EDTA aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50°C; y lavado con aproximadamente 1 % de SDS a aproximadamente 42°C.

Puesto que se puede preparar fácilmente una variedad de anticuerpos humanos, los procedimientos de tratamiento de la presente invención se pueden ejecutar proporcionando al animal o paciente al menos un primer segmento o molécula de ácido nucleico que expresa una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, de la invención en el paciente. El "segmento o molécula de ácido nucleico que expresa un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2" en general estará en la forma de al menos un vector o construcción de expresión, y puede estar en la forma de un vector o

construcción de expresión comprendido dentro de un virus o dentro de una célula hospedante recombinante. Los vectores de terapia génica preferidos de la presente invención serán en general vectores víricos, tal como comprendidos dentro de un retrovirus recombinante, virus de herpes simple (HSV), adenovirus, virus adenoasociado (AAV), citomegalovirus (CMV), y similares.

5

Por lo tanto, esta invención proporciona además segmentos o moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas a dichas secuencias también están incluidas. Las moléculas de ácido nucleico preferidas codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21. Las moléculas de ácido nucleico más preferidas comprenden la secuencia de ácido nucleico definida en la SEQ ID NO: 20 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

10

Un aspecto adicional más proporciona una construcción de expresión o vector de expresión que comprende uno o más de los segmentos o moléculas de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, las construcciones o vectores de expresión son recombinantes. Preferiblemente, dichas construcciones o vectores comprenden además las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

15

Un aspecto adicional más proporciona una célula hospedante o virus que comprende una o más construcciones de expresión o vectores de expresión de la invención. También se proporcionan células hospedantes o virus que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Una célula hospedante o virus que expresa un anticuerpo de la invención forma un aspecto adicional más.

20

Un aspecto adicional más de la invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de la presente invención que comprende una etapa de cultivar las células hospedantes de la invención. Los procedimientos preferidos comprenden las etapas de (i) cultivar una célula hospedante que comprende uno o más de los vectores de expresión recombinantes o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o proteína codificada; y opcionalmente (ii) aislar el anticuerpo o proteína de la célula hospedante o del medio de crecimiento/líquido sobrenadante. Dichos procedimientos de producción también pueden comprender una etapa de purificación del anticuerpo o producto de proteína y/o formular el anticuerpo o producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30

En realizaciones cuando el anticuerpo o proteína de la invención está compuesto por más de una cadena de polipéptido (p. ej., ciertos fragmentos tales como fragmentos Fab), entonces todos los polipéptidos se expresan preferiblemente en la célula hospedante, ya sea del mismo o diferente vector de expresión, de modo que las proteínas completas, p. ej., proteínas de unión de la invención, pueden ensamblarse en la célula hospedante y ser aisladas o purificadas de la misma.

35

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para producir anticuerpos adicionales que se unen al VEGF. Dichos usos implican por ejemplo la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo original para formar un nuevo anticuerpo, en donde dicho anticuerpo original es uno de los anticuerpos de la invención como se define en otra parte del presente documento, y ensayar el nuevo anticuerpo resultante para identificar anticuerpos específicos para el VEGF. Dichos procedimientos se pueden usar para formar múltiples anticuerpos nuevos en los cuales se puede ensayar en todos su capacidad para unirse al VEGF. Preferiblemente, dicha adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos tiene lugar en uno o más de los dominios de CDR.

45

Dicha mutación o modificación a un anticuerpo original se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada usando técnicas bien conocidas y documentadas en la materia, por ejemplo llevando a cabo procedimientos de mutagénesis aleatoria o dirigida. Si se va a usar mutagénesis dirigida, entonces una estrategia para identificar restos adecuados para la mutagénesis usa la resolución de la estructura cristalina del complejo de proteína de unión-antígeno, p. ej., el complejo Ab-Ag, para identificar los restos clave implicados en la unión al antígeno (Davies y Cohen, 1996). Posteriormente, estos restos se pueden mutar para potenciar la interacción. Alternativamente, uno o más de los restos de aminoácido se pueden simplemente seleccionar como objetivo para mutagénesis dirigida y evaluar el efecto en la unión a células tumorales.

50

55

Se puede llevar a cabo la mutagénesis aleatoria de cualquier forma adecuada, p. ej., mediante PCR propensa a error, barajado de cadenas o cepas mutadoras de *E. coli*.

- Por lo tanto, uno o más de los dominios V_H de la invención se pueden combinar con un solo dominio V_L o un repertorio de dominios V_L de cualquier fuente adecuada y ensayar los nuevos anticuerpos para identificar anticuerpos específicos para el VEGF. A la inversa, uno o más de los dominios V_L de la invención se pueden
- 5 combinar con un solo dominio V_H o un repertorio de dominios V_H de cualquier fuente adecuada y ensayar los nuevos anticuerpos resultantes para identificar anticuerpos específicos para el VEGF. Por ejemplo, como se ha descrito antes, se ha mostrado que el dominio V_L del anticuerpo preferido de la invención (r84/PGN311) se puede combinar con varios dominios V_H diferentes y retener todavía la capacidad para unirse al VEGF.
- 10 De manera similar, uno o más, o preferiblemente las tres CDR de los dominios V_H y/o V_L de la invención se pueden injertar en un solo dominio V_H y/o V_L o un repertorio de dominios V_H y/o V_L , según sea adecuado, y ensayar los nuevos anticuerpos resultantes para identificar anticuerpos específicos para el VEGF.
- Las mutaciones dirigidas de las CDR, especialmente CDR3 de las cadenas ligera y/o pesada, se ha mostrado que
- 15 son una técnica eficaz para aumentar la afinidad del anticuerpo y son preferidas. Preferiblemente, se seleccionan como objetivo para mutagénesis bloques de 3 a 4 aminoácidos de la CDR3 o regiones específicas llamadas "puntos calientes".
- Los "puntos calientes" son las secuencias donde tiene lugar la hipermutación somática in vivo (Neuberger y Milstein, 1995). Las secuencias de los puntos calientes se pueden definir como secuencias de nucleótidos de consenso en ciertos codones. La secuencia consenso es el tetranucleótido, RGYW, en el cual R puede ser o bien A o G, Y puede ser C o T y W puede ser o bien A o T (Neuberger y Milstein, 1995). Además, los restos de serina codificados por los nucleótidos AGY están predominantemente presentes en las regiones CDR del dominio variable frente a las codificadas por TCN que corresponden a potenciales secuencias de puntos calientes (Wagner y col., 1995).
- 20 Por lo tanto, se puede analizar en la secuencia de nucleótidos de las CDR de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo de la invención la presencia de secuencias de puntos calientes y codones de AGY. Los puntos calientes identificados de las regiones CDR de la cadena ligera y pesada después se pueden comparar opcionalmente con las secuencias germinales de las cadenas pesada y ligera usando la base de datos International ImMunoGen Tics database (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies y col., 1990). Una secuencia, idéntica a la línea germinal, sugiere que no se ha producido mutación somática; por lo tanto se pueden introducir mutaciones aleatorias que imitan los sucesos somáticos que se ocurren in vivo o alternativamente, se puede llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio, p. ej., en los puntos calientes y/o codones de AGY. En cambio, una secuencia diferente muestra que se han producido ya algunas mutaciones somáticas. Quedará por determinar si la mutación somática in vivo era
- 25 óptima.
- Los puntos calientes preferidos para la mutación son los que codifican aminoácidos expuestos y preferiblemente los que codifican aminoácidos que forman parte de los sitios de unión al antígeno. Otros puntos calientes preferidos para la mutación son los que codifican aminoácidos no conservados. Los puntos calientes que codifican
- 30 aminoácidos ocultos o conservados dentro de las CDR preferiblemente no están mutagenizados. Estos restos normalmente son críticos para la estructura completa y es improbable que interactúen con el antígeno puesto que están ocultos.
- Los procedimientos para llevar a cabo la manipulación descrita antes de aminoácidos y dominios de proteína son bien conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, estas manipulaciones se podrían llevar a cabo de manera conveniente por ingeniería genética a nivel de ácido nucleico en donde se modifican moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de unión adecuadas y dominios de las mismas, de modo que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada resultante se modifique a su vez de la manera adecuada.
- 35 Se puede llevar a cabo el ensayo de la capacidad de uno o más anticuerpos nuevos para unirse de manera específica al VEGF por cualquier procedimiento adecuado, que es bien conocido y se ha descrito en la técnica. Están ampliamente disponibles muestras de VEGF (véase los ejemplos) y éstas se pueden usar fácilmente para ensayar la unión, por ejemplo por procedimientos convencionales tal como ELISA, cromatografía de afinidad, etc.
- 50 Los nuevos anticuerpos producidos por estos procedimientos tendrán preferiblemente una afinidad mayor o potenciada (o al menos una afinidad equivalente) para el VEGF como los anticuerpos originales y se pueden tratar y usar de la misma forma que los anticuerpos de la invención como se describe en otra parte del presente documento (p. ej., para terapia, diagnóstico, en composiciones, etc.).

Los nuevos anticuerpos producidos, obtenidos o que se pueden obtener por estos procedimientos forman un aspecto adicional más de la invención.

Esta invención proporciona además composiciones que comprenden al menos un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo de la invención, que incluye opcionalmente un diluyente. Dichas composiciones pueden ser composiciones farmacéuticamente aceptables o composiciones para usar en estudios de laboratorio. En términos de las composiciones farmacéuticas, se pueden formular preferiblemente para administración parenteral, tal como para administración intravenosa, o para administración ocular.

10 La presente invención proporciona una serie de procedimientos y usos de los anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo de la invención. Con respecto a todos los procedimientos, los términos “un” y “una” se usan para indicar “al menos uno”, “al menos un primer”, “uno o más” o “una pluralidad” de etapas en los procedimientos citados, excepto donde se exponga específicamente. Esto es en particular relevante para las etapas de administración en los procedimientos de tratamiento. Por lo tanto, no sólo se pueden usar diferentes dosis con la presente invención, sino
15 que se pueden usar diferentes números de dosis, p. ej., inyecciones, hasta e incluyendo inyecciones múltiples. Se pueden usar productos terapéuticos combinados, administrados antes, después o durante la administración del anticuerpo terapéutico dirigido contra VEGF.

Se proporcionan diferentes procedimientos in vitro útiles y usos de los anticuerpos de la invención que tienen implicaciones biológicas importantes. Primero se proporcionan procedimientos de, y usos en la unión del VEGF, que comprenden en general poner en contacto eficazmente una composición que comprende VEGF, preferiblemente VEGF libre (no unido a receptor) con al menos un primer anticuerpo dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo.

25 Se proporcionan procedimientos de, y usos en la detección de VEGF, que comprenden en general poner en contacto una composición que se sospecha que contiene VEGF con al menos un primer anticuerpo humano de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo y detectar los complejos así formados. Los procedimientos de detección y usos se pueden usar en relación con muestras biológicas, p. ej., en el diagnóstico de angiogénesis y tumores, y también se
30 proporcionan kits de diagnóstico basados en los mismos.

La presente invención proporciona procedimientos de, y usos en, preferible o específicamente la inhibición de la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2, que comprenden en general poner en contacto, en presencia de VEGF, una población de células o tejidos que incluyen células endoteliales que expresan VEGFR2 (KDR/Flk-1) con
35 una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en condiciones eficaces para inhibir la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2.

Se proporcionan procedimientos de, y usos en la inhibición significativa de la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2, sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR1. Estos procedimientos comprenden poner en contacto, en la presencia de VEGF, una población de células o tejidos que incluyen una población de células endoteliales que expresa VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR1 (Flt-1) con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en condiciones eficaces
45 para inhibir la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2, sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR1.

Procedimientos y usos adicionales de la invención son el análisis de las funciones biológicas de los receptores de VEGF, llamados VEGFR2 y VEGFR1, que comprenden las etapas de:

50 (a) poner en contacto una composición biológica o tejido que comprende VEGF y una población de células que expresan los receptores VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR1 (Flt-1) con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; y

55 (b) determinar el efecto del anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención en al menos una primera respuesta biológica al VEGF; en donde:

(i) una alteración en una respuesta biológica en la presencia del anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de

VEGFR2 de la invención es indicativa de una respuesta mediada por el receptor VEGFR2; y

(ii) el mantenimiento de una respuesta biológica en la presencia del anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, es indicativa de una respuesta mediada por el receptor VEGFR1.

5

Se proporcionan procedimientos y usos de inhibición de la proliferación, que incluyen aquellos para inhibir de manera específica la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, que comprenden en general poner en contacto una población de células o tejidos que incluyen una población de células endoteliales y VEGF con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, en condiciones eficaces para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF.

10

También se proporcionan procedimientos de, y usos en la inhibición de la función de macrófagos inducida por VEGFR2, que comprenden en general poner en contacto una población de células o tejidos que contienen macrófagos y VEGF con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo dirigido contra VEGF, en condiciones eficaces para inhibir la función de macrófagos inducida por VEGFR2.

20

Los procedimientos anteriores se aplican preferiblemente en el tratamiento de tumores, en donde los procedimientos inhiben la función de macrófagos inducida por VEGFR2, reduciendo así la capacidad de los macrófagos infiltrantes de tumor, que expresan VEGFR2, para promover el progreso y/o metástasis tumoral.

25

Se proporcionan además procedimientos de, y usos en la inhibición de la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, y opcionalmente, angiogénesis, sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condrocitos mediada por VEGFR1. Los procedimientos comprenden en general poner en contacto una población de células o tejidos que contienen células endoteliales y al menos uno de osteoclastos y condrocitos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, en condiciones eficaces para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, o angiogénesis, sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condrocitos mediada por VEGFR1.

30

35

Los procedimientos y usos anteriores se pueden realizar in vitro e in vivo, en este último caso, los tejidos o células están localizados dentro de un animal y el anticuerpo humano dirigido contra VEGF se administra al animal. En ambos casos, los procedimientos y usos se convierten en procedimientos y usos para inhibir la angiogénesis, que comprenden poner en contacto un tejido que comprende, o una población de, vasos sanguíneos angiogénicos o potencialmente angiogénicos, es decir, los expuestos a o potencialmente expuestos al VEGF, con una composición antiangiogénica que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en condiciones eficaces para inhibir la angiogénesis.

40

Cuando se mantienen ex vivo poblaciones de vasos sanguíneos potencialmente angiogénicos, la presente invención tiene utilidad en programas de descubrimiento de fármacos. Los ensayos de cribado in vitro, con controles positivos y negativos fiables, son útiles como una primera etapa en el desarrollo de fármacos para inhibir o promover la angiogénesis, así como en la delineación de información adicional en el proceso angiogénico. Cuando la población de vasos sanguíneos potencialmente angiogénicos se localiza dentro de un animal o paciente, la composición antiangiogénica se administra al animal como una forma de terapia.

50

Las "cantidades biológicamente eficaces", en términos de cada uno de los procedimientos inhibidores anteriores son, por lo tanto, cantidades de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención, eficaces para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF; para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, sin inhibir significativamente sucesos celulares inducidos por VEGFR1; para inhibir la proliferación y/o migración, o angiogénesis, de células endoteliales inducida por VEGF, sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condrocitos mediada por VEGFR1; y en conjunto, para reducir la proliferación y/o migración de células endoteliales vasculares de una manera eficaz para inhibir el crecimiento o angiogénesis de vasos sanguíneos.

55

Por lo tanto, la invención proporciona procedimientos de, y usos en la inhibición de la angiogénesis inducida por el VEGF, y preferiblemente, el tratamiento de una enfermedad angiogénica, sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condrocitos mediada por el VEGF. Los procedimientos comprenden en general poner en contacto una población de células o tejidos que contienen células endoteliales y al menos uno de osteoclastos o condrocitos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, en condiciones eficaces para inhibir la angiogénesis inducida por el VEGF y para tratar una enfermedad angiogénica sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condrocitos mediada por el VEGF.

10

Se proporcionan además procedimientos de, y usos en la inhibición de la angiogénesis inducida por el VEGF, y preferiblemente, el tratamiento de una enfermedad angiogénica, sin provocar efectos secundarios significativos en el metabolismo óseo. Los procedimientos comprenden en general poner en contacto un tejido o una población de vasos angiogénicos que contienen células endoteliales vasculares y al menos uno de osteoclastos o condrocitos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, en condiciones eficaces para inhibir la angiogénesis inducida por el VEGF, y para tratar una enfermedad angiogénica, sin provocar efectos secundarios significativos en el metabolismo óseo no deteriorando significativamente las actividades de los osteoclastos o condrocitos.

20

Se proporcionan cribado de fármacos antiangiogénicos (in vitro) y terapia (in vivo) en términos de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por vascularización indeseable, inadecuada, aberrante, excesiva y/o patológica. Es bien conocido por los expertos en la materia que puesto que la angiogénesis aberrante ocurre en una amplia variedad de enfermedades y trastornos, se puede usar una terapia anti-angiogénica determinada, una vez que se muestra que es eficaz en cualquier sistema modelo aceptable, para tratar la variedad completa de enfermedades y trastornos relacionados con la angiogénesis.

25

Los procedimientos y usos de la presente invención se dirigen en particular al uso en animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquier forma de tumor vascularizado; degeneración macular, incluyendo degeneración macular relacionada a la edad; artritis, incluyendo artritis reumatoide; aterosclerosis y placas ateroscleróticas; retinopatía diabética y otras retinopatías; hiperplasias tiroidea, incluyendo enfermedad de Grave; hemangioma; glaucoma neovascular; y psoriasis.

30

Los procedimientos y usos de la invención se dirigen además al tratamiento de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, y reestenosis vascular, incluyendo reestenosis después de angioplastia. Otros objetivos a los que van dirigidos los procedimientos terapéuticos y usos son animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar angiofibroma, dermatitis, endometriosis, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, enfermedades y trastornos inflamatorios, granuloma piogénico, esclerodermia, sinovitis, tracoma y adhesiones vasculares.

40

Como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.712.291 y 6.524.583, cada uno de los grupos anteriores de tratamiento algo preferidos no son de ninguna manera exhaustivos de los tipos de condiciones que se van a tratar por la presente invención. Las patentes de EE.UU. n° 5.712.291 y 6.524.583, son cada una referencia en el presente documento para determinados propósitos específicos, incluyendo el propósito de identificar una serie de afecciones diferentes que se pueden tratar de manera eficaz mediante un producto terapéutico antiangiogénico; para el propósito de mostrar que el tratamiento de todas las enfermedades angiogénicas representa un concepto unificado, una vez que se ha descrito y reivindicado una categoría definida de compuestos inhibidores de angiogénesis (en el presente caso, anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención), y el propósito de mostrar que el tratamiento de todas las enfermedades angiogénicas es posible por los datos de solo un sistema modelo único.

50

En más aspectos adicionales, y como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.712.291 y 6.524.583, los procedimientos y usos de la presente invención se dirigen al tratamiento de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, proliferación anormal de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Bechets, tumores transportados por sangre, enfermedad obstructiva carótida, quemaduras químicas, neovascularización coroidea, inflamación crónica, desprendimiento de retina crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, uso excesivo de lentes de contacto, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidérmica, úlceras fúngicas, infección por Herpes simple, infecciones por

55

Herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración de lípidos, enfermedad de Lyme, queratolisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones por micobacterias diferentes de lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, fosea óptica, síndrome de Osler-Weber (Osler-Weber-Rendu, osteoartritis, enfermedad de Pagets, pars planitis, penfigoide, filectenulosis, poliartritis, complicaciones post-láser, infecciones
 5 protozoarias, pseudoxantoma elástico, queratoconjuntivitis seca de pterigión, queratotomía radial, neovascularización de la retina, retinopatía de prematuridad, fibroplasias retrolentales, sarcoide, escleritis, anemia de células falsiformes, síndrome de Sogrens, tumores sólidos, enfermedad de Stargarts, enfermedad de Steven Johnson, queratoconjuntivitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, traumatismo, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma,
 10 tumores de retinoblastoma, tumores de rabdomiosarcoma, colitis ulcerativa, oclusión de venas, deficiencia de Vitamina A y sarcoidosis de Wegeners.

La presente invención proporciona además procedimientos y usos para el tratamiento de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, artritis, junto con el tratamiento de la artritis usando agentes inmunológicos
 15 descritos en la patente de EE.UU. nº 5.753.230. La patente de EE.UU. nº 5.972.922 ilustra más la aplicación de estrategias antiangiogénicas al tratamiento de la angiogénesis indeseada, asociada con diabetes, enfermedades parasitarias, curación anormal de heridas, hipertrofia después de cirugía, quemaduras, lesión o traumatismo, inhibición de crecimiento de cabello, inhibición de ovulación y formación de cuerpo lúteo, inhibición de implantación e inhibición de desarrollo de embrión en el útero. Por lo tanto, todas las afecciones anteriores se están contempladas
 20 para el tratamiento por los procedimientos y usos de la presente invención.

La patente de EE.UU. nº 5.639.757 ilustra el uso de estrategias antiangiogénicas al tratamiento general de rechazo de injerto. El tratamiento de la inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, efusión pericárdica, tal como la asociada con pericarditis, y efusión pleural usando estrategias antiangiogénicas basadas en la inhibición del
 25 VEGF, se describe en el documento WO 98/45331. Por lo tanto, están contemplados animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquiera de las afecciones anteriores, para el tratamiento por los procedimientos y usos de la presente invención.

Como se describe en el documento WO 98/16551, las moléculas biológicas que antagonizan la función del VEGF
 30 también son adecuadas para usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable. Por consiguiente, los anticuerpos que antagonizan el VEGF, los procedimientos y usos de la presente invención, son aplicables al tratamiento de animales y pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar, enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable, p. ej., edema asociado con tumores cerebrales, ascitis asociada con malignidades, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar,
 35 síndrome nefrótico, efusión pericardiaca y efusión pleural y similares.

Aunque se hace posible el tratamiento de todas las enfermedades anteriores dentro de la presente invención unificada, un aspecto en particular preferido de los procedimientos y usos de la presente invención es la aplicación de terapia anti-angiogénica a animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, un tumor sólido
 40 vascularizado, un tumor metastático o metástasis de un tumor primario.

Se proporcionan además procedimientos de, y usos para la inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF, y preferiblemente, ejercer efecto antitumoral o antitumoral mejorado sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condroclastos por el VEGF. Los procedimientos comprenden en general poner en contacto un tejido,
 45 entorno tumoral o población de vasos angiogénicos que contienen células endoteliales vasculares y al menos uno de macrófagos, osteoclastos o condroclastos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, en condiciones eficaces para inhibir la angiogénesis inducida por el VEGF, y para ejercer un efecto antitumoral o antitumoral mejorado sin inhibir significativamente la estimulación de
 50 osteoclastos o condroclastos por el VEGF.

La presente invención proporciona por lo tanto adicionalmente procedimientos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con la angiogénesis, que comprende administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad o cáncer una cantidad terapéuticamente
 55 eficaz de al menos una primera composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno o inmunconjugado de dicho anticuerpo dirigido contra VEGF.

Además, los procedimientos y usos de la invención incluyen procedimientos y usos para inhibir la linfangiogénesis,

que comprenden poner en contacto un tejido que comprende, o una población de vasos linfáticos ("sistema linfático"), en particular, sistema linfático expuesto a o potencialmente expuesto al VEGF, con una composición antiangiogénica que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en condiciones
5 eficaces para inhibir la linfangiogénesis.

Cuando las poblaciones de sistema linfático se mantienen *ex vivo*, la presente invención tiene utilidad en programas de descubrimiento de fármacos. Cuando la población de sistema linfático está localizada dentro de un animal o paciente, la composición de la invención se administra al animal como una forma de terapia.

10 En términos de inhibir la linfangiogénesis, las "cantidades biológicamente eficaces" son cantidades de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención, eficaces para inhibir la linfangiogénesis inducida por el VEGF, es decir, linfangiogénesis estimulada por VEGF-A inducida por VEGFR2. Preferiblemente, la linfangiogénesis inducida por el VEGF será inducida sin inhibir significativamente los sucesos estimulados por
15 VEGFR1, tales como estimulación de osteoclastos o condroclastos.

Por lo tanto, la invención incluye procedimientos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con la linfangiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con la linfangiogénesis, que comprenden administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad o cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de al
20 menos una primera composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado de dicho anticuerpo dirigido contra VEGF.

Un aspecto adicional más de la invención proporciona el uso de los anticuerpos humanos de la invención o un
25 fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado de dicho anticuerpo, en la fabricación de una composición o medicamento para usar en terapia, formación de imágenes o diagnóstico.

Un aspecto adicional más proporciona los anticuerpos humanos de la invención o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado de dicho anticuerpo para usar en terapia, diagnóstico o formación de imágenes.

30 Además, la invención proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos humanos de la invención o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado de dicho anticuerpo, con uno o más excipientes, vehículos, diluyentes, amortiguadores o estabilizantes farmacéuticamente aceptables. Los procedimientos *in vivo* como se describen en el presente documento se llevan a cabo en general en un mamífero. Se puede tratar cualquier
35 mamífero, por ejemplo seres humanos y cualquier ganado, animal doméstico o de laboratorio. Los ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, ovejas, conejos, vacas y monos. Sin embargo, preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Por lo tanto, el término "animal" o "paciente" como se usa en el presente documento incluye cualquier mamífero, por
40 ejemplo seres humanos y cualquier animal de ganado, doméstico o de laboratorio. Los ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, ovejas, conejos, vacas y monos. Sin embargo, preferiblemente, el animal o paciente es un sujeto humano.

Esta invención asocia tanto procedimientos antiangiogénicos que usan anticuerpos no conjugados o desnudos y
45 fragmentos de los mismos, como procedimientos dirigidos a la vasculatura que usan inmunoconjugados en los cuales un anticuerpo humano de la invención o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une operativamente a un agente terapéutico. Salvo que se exponga específicamente de otro modo o se esté claro en términos científicos, los términos "anticuerpo y fragmento del mismo", como se usan en el presente documento, por lo tanto significan un anticuerpo humano "no conjugado o desnudo", o fragmento, que no está unido a otro agente, en particular un agente
50 terapéutico o de diagnóstico. Estas definiciones no excluyen modificaciones del anticuerpo, tales como, solo a modo de ejemplo, modificaciones para mejorar la semivida biológica, afinidad, avidéz u otras propiedades del anticuerpo, o combinaciones del anticuerpo con otros efectores.

Los procedimientos de tratamiento antiangiogénico y usos de la invención también abarcan el uso tanto de
55 anticuerpos no conjugados o desnudos como de inmunoconjugados. En los procedimientos de tratamiento antiangiogénico basados en inmunoconjugados, el anticuerpo humano de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une preferiblemente operativamente a un segundo agente antiangiogénico (siendo el propio anticuerpo dirigido contra VEGF el primer agente antiangiogénico). Los agentes antiangiogénicos unidos pueden ser los que tienen un efecto antiangiogénico directo o indirecto.

Los procedimientos de tratamiento antiangiogénico y usos comprenden administrar a un animal o paciente con una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Igualmente, el anticuerpo administrado puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos para, y usos en el tratamiento de cáncer metastático comprenden administrar a un animal o paciente con cáncer metastático una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o fragmento de unión al antígeno del mismo. Los procedimientos adicionales son aquellos en donde el anticuerpo administrado puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos para, y usos en la reducción de la metástasis de un cáncer primario comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, a un animal o paciente que tiene, o se ha tratado de un cáncer primario. De manera similar, el anticuerpo administrado puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden además administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad, por ejemplo, un tumor vascularizado, al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad o tumor vascularizado. Igualmente, el anticuerpo administrado se puede asociar de manera operativa con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden además administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad o cáncer al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en una cantidad eficaz para inhibir la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis en el sitio de la enfermedad o canceroso. El anticuerpo administrado alternativamente puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, también comprenden administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o fragmento de unión al antígeno del mismo; en donde el anticuerpo dirigido contra VEGF inhibe sustancialmente la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR1 (Flt-1). Igualmente, el anticuerpo administrado puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Otros procedimientos adicionales para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad, cáncer o tumor vascularizado una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un primer anticuerpo dirigido contra VEGF, humano, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; en donde el anticuerpo dirigido contra VEGF inhibe sustancialmente la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR1 (Flt-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad, cáncer o tumor vascularizado sin deteriorar significativamente los sucesos mediados por VEGFR1 en el animal. El anticuerpo administrado también se puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos adicionales para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad, cáncer o tumor vascularizado, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un primer

anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; en donde el anticuerpo dirigido contra VEGF inhibe de manera sustancial la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR1 (Flt-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis en el sitio de enfermedad, cáncer o tumor vascularizado, incluyendo la inhibición de los macrófagos que expresan VEGFR2 en el sitio de enfermedad, en particular macrófagos infiltrantes de tumor, que expresan VEGFR2. El anticuerpo administrado también puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Todavía procedimientos adicionales para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad, cáncer o tumor vascularizado, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; en donde el anticuerpo dirigido contra VEGF inhibe de manera sustancial la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF, VEGFR1 (Flt-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis en el sitio de enfermedad, cáncer o tumor vascularizado, sin deteriorar significativamente la actividad de osteoclastos y/o condrocitos en el animal. Igualmente, el anticuerpo administrado puede estar operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los procedimientos para, y usos en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden además administrar a un animal o paciente con dicha enfermedad, por ejemplo, un tumor vascularizado, al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis en el sitio de enfermedad o tumor vascularizado sin ejercer un efecto adverso significativo en el metabolismo óseo.

Los procedimientos de tratamiento antiangiogénico y usos anteriores, implicarán en general la administración de la composición farmacéuticamente eficaz al animal o paciente de manera sistémica, tal como por inyección transdérmica, intramuscular, intravenosa y similar. Sin embargo, será aceptable cualquier vía de administración que permita que el agente terapéutico se sitúe en el sitio o sitios angiogénicos, incluyendo células endoteliales vasculares intratumorales o tumorales. Por lo tanto, otras vías de suministro adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica y vaginal. Se hace referencia a la patente de EE.UU. n° 5.712.291 en el presente documento, con el propósito de incluir la descripción adicional de diferentes vías de administración que se pueden incluir en relación con el tratamiento de una enfermedad o trastorno angiogénico.

Para los usos y procedimientos para el tratamiento de la artritis, por ejemplo, se puede usar la administración intrasinovial, como se describe para otros agentes inmunológicos en la patente de EE.UU. n° 5.753.230. Para afecciones asociadas con el ojo, están contempladas las formulaciones y administración oftálmica.

“Administración”, como se usa en el presente documento, significa proporcionar o suministrar el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, en una cantidad o cantidades y durante periodos de tiempo eficaces para ejercer efectos antiangiogénicos y/o antitumorales. La administración pasiva de productos terapéuticos proteínicos se prefiere en general, en parte, por su simplicidad y reproducibilidad.

Sin embargo, el término “administración” se usa en el presente documento para referirse a cualquiera y todos los medios por los cuales los anticuerpos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención se suministran o proporcionan de otro modo a la vasculatura tumoral. La “administración” incluye por lo tanto proporcionar células que producen el anticuerpo dirigido contra VEGF humano bloqueante de VEGFR2 de la invención de una manera eficaz para dar como resultado el suministro al tumor. En dichas realizaciones, puede ser deseable formular o empaquetar las células en una membrana, estructura o dispositivo implantable, selectivamente permeable, en general uno que se pueda retirar para cesar la terapia. El anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 exógeno de la invención, en general todavía se preferirá, puesto que esto representa un procedimiento no invasivo que permite que se siga y controle estrechamente la dosis.

Los procedimientos terapéuticos y usos de la invención también se extienden a proporcionar ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención de una manera eficaz para dar como resultado su expresión en la proximidad del tumor o su localización en el tumor. Se puede usar cualquier técnica de terapia génica, tal como suministro de ADN desnudo, genes y vectores recombinantes, suministro basado en células, incluyendo manipulación ex vivo de células del paciente y similares.

En realizaciones todavía adicionales, la invención proporciona procedimientos para, y usos en el suministro de agentes terapéuticos o de diagnóstico seleccionados a los vasos sanguíneos angiogénicos asociados con la enfermedad. Dichas realizaciones se usan preferiblemente para suministrar agentes terapéuticos o de diagnóstico seleccionados a tumor o vasculatura intratumoral o estroma, y comprenden administrar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado una cantidad biológicamente eficaz de una composición que comprende al menos un primer inmunoconjugado en el cual un agente de diagnóstico o terapéutico está operativamente unido a un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno del mismo.

10

Aunque no se requiere entender el mecanismo de acción subyacente de los aspectos a los que se dirige la invención con el fin de practicar dichas realizaciones, se cree que los anticuerpos de la invención suministran agentes unidos a la vasculatura angiogénica y tumoral en virtud de la unión a VEGF unido al VEGFR1 expresado en las mismas. Estos procedimientos y usos de la invención se refieren por lo tanto al suministro de agentes terapéuticos o de diagnóstico seleccionados a vasos sanguíneos angiogénicos, vasculatura tumoral o intratumoral, y comprenden administrar a un paciente o animal que necesite tratamiento una cantidad biológicamente eficaz de una composición que comprende un inmunoconjugado donde un agente de diagnóstico o terapéutico está operativamente unido a al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de una manera eficaz para permitir la unión del anticuerpo al VEGF unido al VEGFR1 expresado, expresado en exceso o regulado por aumento en los vasos sanguíneos angiogénicos, vasculatura tumoral o intratumoral, suministrando así el agente terapéutico o de diagnóstico al VEGF-VEGFR1 en los vasos sanguíneos angiogénicos, vasculatura tumoral o intratumoral.

El suministro de agentes terapéuticos seleccionados a la vasculatura tumoral o intratumoral o estroma actúa para detener el flujo sanguíneo, o detener específicamente el flujo sanguíneo, en la vasculatura tumoral; para destruir, o destruir específicamente, la vasculatura tumoral; y para inducir necrosis, o necrosis específica en un tumor. Estos procedimientos y usos por lo tanto se pueden resumir como procedimientos para tratar un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado, que comprende administrar al animal o paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, operativamente unido a un agente terapéutico.

Las "cantidades terapéuticamente eficaces" para usar en la invención son cantidades de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o inmunoconjugados del mismo, eficaces para matar específicamente al menos una parte de las células endoteliales vasculares tumorales o intratumorales; para inducir específicamente apoptosis en al menos una parte de las células endoteliales vasculares tumorales o intratumorales; para promover específicamente la coagulación en al menos una parte de los vasos sanguíneos tumorales o intratumorales; para obstruir o destruir específicamente al menos una parte de los vasos transportadores de sangre del tumor; para inducir específicamente necrosis en al menos una parte de un tumor; y/o inducir regresión o remisión tumoral tras la administración a animales o pacientes seleccionados. Dichos efectos se logran a la vez que se presenta poca o ninguna unión a, o poca o ninguna muerte de, células endoteliales vasculares en tejidos sanos normales; poca o ninguna coagulación en, oclusión o destrucción de vasos sanguíneos en tejidos sanos normales; y se ejercen efectos secundarios adversos insignificantes o tratables en tejidos sanos normales del animal o paciente.

Los términos "preferiblemente" y "específicamente", como se usan en el presente documento en el contexto de promover la coagulación en, o destruir, la vasculatura tumoral, y/o en el contexto de unirse a estroma tumoral y/o provocar necrosis tumoral, significan, por lo tanto, que el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención o inmunoconjugados del mismo, funciona para lograr unión al estroma, coagulación, destrucción y/o necrosis tumoral que se limita sustancialmente al estroma tumoral, vasculatura y sitio tumoral, y no se extiende de manera sustancial para producir coagulación, destrucción y/o necrosis de tejido en tejidos sanos normales del animal o sujeto. Por lo tanto, la estructura y función de células y tejidos sanos se mantiene sustancialmente sin deterioro por la práctica de la invención.

Aunque los anticuerpos de la invención suministran eficazmente agentes a vasculatura angiogénica y tumoral por la unión al VEGF en asociación con VEGFR1, funcionan otros procedimientos y usos basados en el suministro de un agente terapéutico al estroma tumoral, en donde ejerce un efecto terapéutico en los vasos cercanos. Estos procedimientos y usos comprenden administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado, un inmunoconjugado que comprende un agente terapéutico operativamente unido a al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo,

en una cantidad eficaz para unir el inmunoconjugado al VEGF no unido a receptor dentro del estroma tumoral.

Estos procedimientos y usos comprenden administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado, un inmunoconjugado que comprende un agente terapéutico operativamente unido a al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en una cantidad eficaz para situar el inmunoconjugado dentro del estroma tumoral de modo que el agente terapéutico unido ejerza un efecto antitumoral en la vasculatura tumoral circundante y/o células tumorales.

Los anticuerpos y composiciones, así como los procedimientos y usos, de la invención se extienden por lo tanto a composiciones que comprenden anticuerpos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 que comprenden al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, operativamente unido a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico, más en particular, un primer agente terapéutico "distinto o exógeno". En relación con esto, el "anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2" se puede denominar él mismo un "primer agente terapéutico". Por consiguiente, cualquier agente terapéutico unido se puede denominar un primer "agente terapéutico distinto o exógeno", significando que también es un agente terapéutico, pero distinto de y unido al anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2. La terminología equivalente para dichos conjugados es para describir al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, como que está operativamente unido a al menos un "segundo, distinto" agente terapéutico o de diagnóstico.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención o conjugados terapéuticos se unen preferiblemente a uno o más agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes antitubulina, agentes anticelulares o citotóxicos, o coagulantes (factores de coagulación).

La invención proporciona por lo tanto una variedad de anticuerpos conjugados y fragmentos de los mismos en los que el anticuerpo humano está operativamente unido a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico. El término "inmunoconjugado" se usa de manera amplia para definir la asociación operativa del anticuerpo con otro agente eficaz y no se pretende que se refiera solo a ningún tipo de asociación operativa, y no se limita en particular a "conjugación" químicas. Las proteínas de fusión recombinante están en particular contempladas. En tanto que el agente de suministro o agente dirigido es capaz de unirse al objetivo y el agente terapéutico o de diagnóstico es suficientemente funcional tras la distribución, será adecuado el modo de unión.

La unión de los agentes mediante porciones de carbohidrato en anticuerpos también se contempla. La glicosilación, tanto unida por O como unida por N se presenta de manera natural en los anticuerpos. Se pueden modificar anticuerpos recombinantes para recrear o crear sitios adicionales de glicosilación, si se desea, lo cual se logra simplemente por modificación genética de secuencias de aminoácidos adecuadas (tales como Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser, o Thr) en la secuencia primaria del anticuerpo.

Los agentes actualmente preferidos para usar en el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o conjugados terapéuticos de la invención y procedimientos y usos relacionados son aquellos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo y/o aquellos seleccionados para un tipo particular de tumor o paciente particular. Los "agentes terapéuticos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo" incluyen agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis y fármacos antitubulina, cualquiera o cualesquiera de los cuales se prefiere para usar en el presente documento.

La unión o asociación de los agentes preferidos con los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención da "inmunoconjugados", en donde dichos inmunoconjugados a menudo tienen propiedades antitumorales mejoradas e incluso sinérgicas. Los agentes antiangiogénicos actualmente preferidos para usar de esta forma son angiostatina, endostatina, cualquiera de las angiopoyetinas, vasculostatina, canstatina y maspina. Los fármacos antitubulina actualmente preferidos incluyen colchicina, taxol, vinblastina, vincristina, vindescina y una o más de las combretastatinas.

El uso de agentes anticelulares y citotóxicos da como resultado "inmunotoxinas" de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención, mientras que el uso de factores de coagulación da como resultado el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 o "coagulandos" de la invención. El uso de al menos dos agentes terapéuticos también está contemplado, tales como combinaciones de uno o más agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, fármacos antitubulina, agentes anticelulares y citotóxicos y factores de coagulación.

En determinadas aplicaciones, los productos terapéuticos de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención estarán operativamente unidos a agentes citotóxicos, citostáticos o anticelulares de otro modo que tienen la capacidad de matar o suprimir el crecimiento o división celular de células endoteliales. Los agentes anticelulares adecuados incluyen agentes quimioterapéuticos, así como citotoxinas y agentes citostáticos. Los agentes citostáticos son en general los que alteran el ciclo celular natural de una célula objetivo, preferiblemente de modo que la célula se salga del ciclo celular.

Los agentes terapéuticos de ejemplo incluyen: esteroides; citoquinas; antimetabolitos, tales como arabinósido de citosina, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides de la vinca; antibióticos; demecolcina; etopósido; mitramicina; y agentes alquilantes anti-tumorales, tales como clorambucilo o melfalano. En realidad, se puede usar cualquiera de los agentes descritos en el presente documento en la tabla C. Determinados agentes anti-celulares preferidos son inhibidores de la síntesis de ADN, tales como daunorubicina, doxorubicina/adriamicina, y similares. En general, el taxol/paclitaxel, docetaxel, cisplatino, gemcitabina, una combretastatina y doxorubicina/adriamicina son antineoplásicos actualmente preferidos.

De las citoquinas y quimioquinas, los agentes actualmente preferidos son IL-2, IL-12, TNF- α , interferón- α (IFN- α), IFN- β , IFN- γ , y LEC (quimioquina expresada en hígado). Los inhibidores de ATPasa tipo V también son actualmente preferidos, tales como salicililalamida, concanamicina o bafilomicina, como lo son los inhibidores de síntesis de proteínas tales como psimberina, pederina, irciniastatina A.

En determinadas aplicaciones terapéuticas, se preferirán restos de toxinas, debido a la mucho mayor capacidad de la mayoría de las toxinas para suministrar un efecto citolítico, en comparación a otros agentes potenciales. Por lo tanto, determinados agentes anticelulares preferidos para las construcciones de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención son toxinas derivadas de planta, hongos, o bacterias. Las toxinas de ejemplo incluyen epipodofiltoxinas; endotoxina bacteriana o la parte de lípido A de endotoxina bacteriana; proteínas inactivadoras de ribosomas, tales como saporina o gelonina; a-sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tales como ribonucleasa placentaria; toxina diftérica y exotoxina de *pseudomonas*. Los ejemplos actualmente preferidos son toxinas ricina, gelonina, abrina, difteria, pseudomonas y pertusis.

Determinadas toxinas preferidas son las toxinas de cadena A, tales como la cadena A de ricina. La parte de toxina más preferida a menudo es la cadena A de ricina que se ha tratado para modificar o eliminar restos de hidratos de carbono, llamada "cadena A desglicosilada" (dgA). La cadena A de ricina desglicosilada se prefiere debido a su potencia extrema, semivida más prolongada y debido a que es económicamente factible fabricarla con calidad y escala clínica. También se puede usar cadena A de ricina recombinante y/o truncada.

Para dirigirse a tumores y para el tratamiento con inmunotoxinas, se hace referencia a las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a agentes anticelulares y citotóxicos: patentes de EE.UU. nº 6.004.554; 5.855.866; 5.965.132; 5.776.427; 5.863.538; 5.660.827 y 6.051.230.

El anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la presente invención se pueden unir a un fármaco antitubulina. Los "fármacos antitubulina", como se usa en el presente documento, significan cualquier agente, fármaco, profármaco o combinación de los mismos que inhibe la mitosis celular, preferiblemente inhibiendo directa o indirectamente las actividades de la tubulina necesarias para la mitosis celular, preferiblemente la polimerización o despolimerización de tubulina

Los fármacos antitubulina actualmente preferidos para usar en el presente documento son colchicina; taxanos, tales como taxol, docetaxel y paclitaxel; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina y vindescina; y combretastatinas. Las combretastatinas de ejemplo son combretastatina A, B y/o D, incluyendo A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3, B-4, D-1 y D-2 y formas de profármaco de las mismas

Los productos terapéuticos del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, pueden comprender un componente que sea capaz de promover la coagulación, es decir, un coagulante. Aquí, el anticuerpo dirigido puede estar unido directa o indirectamente, por ejemplo, mediante otro anticuerpo, a un factor que estimula directa o indirectamente la coagulación.

Los factores de coagulación preferidos para dichos usos son el factor tisular (TF) y derivados del TF, tales como TF truncado (tTF), TF dimérico, trimérico, polimérico/multimérico, y TF mutante deficiente en la capacidad activar el factor VII. Otros factores de coagulación adecuados incluyen coagulantes dependientes de vitamina K tales como el

factor II/IIa, factor VII/VIIa, factor IX/IXa y factor X/Xa; factores de coagulación dependientes de vitamina K que carecen de la modificación Glu; activador de factor X de veneno de víbora de Russell; compuestos activadores de plaquetas, tales como tromboxano A₂ y tromboxano A₂ sintasa; e inhibidores de fibrinolisis, tales como α2-antiplasmina. En general, se prefiere actualmente el factor tisular truncado (tTF).

5

Se describe el direccionamiento a tumores y el tratamiento con coagulandos en las siguientes patentes, a cada una de las cuales se hace referencia para el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a los coagulandos y factores de coagulación: patentes de EE.UU. n° 5.855.866; 5.965.132; 6.093.399; 6.004.555; 5.877.289; y 6.036.955.

10

La preparación de inmunos conjugados e inmunotoxinas en general se conoce bien en la materia (véase, p. ej., patente de EE.UU. n° 4.340.535). Se hace referencia a cada una de las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a la generación, purificación y uso de inmunotoxinas: patentes de EE.UU. n° 6.004.554; 5.855.866; 5.965.132; 5.776.427; 5.863.538; 5.660.827 y

15 6.051.230.

En la preparación de inmunos conjugados e inmunotoxinas, se pueden lograr ventajas a través del uso de determinados ligadores. Por ejemplo, a menudo se prefieren ligadores que contienen un enlace de disulfuro que tiene "impedido" estérico, debido a su mayor estabilidad in vivo, impidiendo de este modo la liberación del resto de

20

Dependiendo del compuesto de toxina específico usado, puede ser necesario proporcionar un espaciador peptídico que una operativamente el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención y el compuesto de toxina, en donde el espaciador peptídico es capaz de plegarse en una estructura de bucle unida por disulfuro. La escisión proteolítica dentro del bucle dará entonces un polipéptido heterodímero en donde el anticuerpo y el compuesto de toxina están unidos solo por un enlace único de disulfuro.

25

Cuando se usan determinados compuestos de toxina diferentes, se puede proporcionar un espaciador peptídico no escindible para unir operativamente el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención y el compuesto de toxina. Las toxinas que se pueden usar junto con los espaciadores peptídicos no escindibles son las que se pueden convertir ellas mismas por escisión proteolítica, en una forma citotóxica unida por disulfuro. Un ejemplo de dicho compuesto de toxina es un compuesto de exotoxina de *Pseudomonas*.

30

También se pueden conjugar satisfactoriamente una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros agentes farmacológicos con los productos terapéuticos del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención. Los agentes antineoplásicos de ejemplo que se han conjugado con los anticuerpos incluyen doxorubicina, daunomicina, metotrexato y vinblastina. Además, la unión de otros agentes tales como neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α-amanitina se han descrito (véase las patentes de EE.UU. n° 5.660.827; 5.855.866; y 5.965.132).

40

También se pone en práctica fácilmente la preparación de coagulandos. La asociación operativa de uno o más factores de coagulación con un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención puede ser un enlace directo, tal como los descritos anteriormente para las inmunotoxinas. Alternativamente, la asociación operativa puede ser una unión indirecta, tal como cuando el anticuerpo está operativamente unido a una segunda región de unión, preferiblemente un anticuerpo o región de unión al antígeno de un anticuerpo, que se une al factor de coagulación. El factor de coagulación se debe unir al anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención en un sitio distinto de su sitio de coagulación funcional, en particular cuando

50

Los coagulandos unidos indirectamente se basan a menudo en anticuerpos biespecíficos. La preparación de anticuerpos biespecíficos también se conoce bien en la materia. Un procedimiento de preparación comprende la preparación separada de anticuerpos que tienen especificidad para el componente tumoral objetivo, por una parte y el agente coagulador por otra parte. Después se generan los fragmentos peptídicos F(ab'γ)₂ de los dos anticuerpos elegidos, seguido de la reducción de cada uno para proporcionar fragmentos Fab'γ_{SH} separados. Los grupos SH en uno de los dos de la pareja que se van a acoplar, se alquilan entonces con un reactivo reticulador, tal como o-fenilendimaleimida, para proporcionar grupos maleimida libres en uno de la pareja. Después, este de la pareja se puede conjugar al otro por medio de un enlace tioéter, para dar el heteroconjugado F(ab'γ)₂ deseado (Glennie y col,

55

1987). También se pueden llevar a cabo otros procedimientos, tales como reticulación con SPDP o proteína A.

En la preparación de inmunoconjugados, inmunotoxinas y coaguligandos, se puede usar la expresión recombinante. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la invención, elegido, y el agente terapéutico, toxina o coagulante, se unen en el marco en un vector de expresión. Por lo tanto la expresión recombinante da como resultado la traducción del ácido nucleico para dar el inmunoconjugado deseado. Los reticuladores químicos y los puentes de avidina:biotina también pueden unir los agentes terapéuticos al anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención.

10 Se hace referencia a cada una de las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a la preparación, purificación y uso de coaguligandos, incluyendo coaguligandos de anticuerpos biespecíficos: patentes de EE.UU. n° 5.855.866; 5.965.132; 6.093.399; 6.004.555; 5.877.289; y 6.036.955.

15 Los inmunoconjugados con agentes radioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes antitubulina, toxinas y coagulantes, ya sea preparados por conjugación química o expresión recombinante, pueden usar un enlace biológicamente liberable y/o un espaciador o ligador escindible de forma selectiva. Dichas composiciones preferiblemente son razonablemente estables durante la circulación y preferiblemente o específicamente se liberan tras el suministro al sitio de enfermedad o de tumor.

20 Algunos ejemplos preferidos son espaciadores sensibles a ácidos, en donde están contemplados en particular anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención unidos a colchicina o doxorubicina. Otros ejemplos preferidos son ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para peptidasas y/o proteinasas que están específica o preferiblemente presentes o activos dentro de un sitio de enfermedad, tal como un entorno tumoral. El suministro del inmunoconjugado al sitio de enfermedad o tumor da como resultado la escisión y la liberación relativamente específica del factor de coagulación.

25 Los ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para uroquinasa, pro-uroquinasa, plasmina, plasminógeno, TGF β , estafiloquinasa, trombina, factor IXa, factor Xa o metaloproteinasa (MMP), tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisin, son en particular preferidos, como se describe y posibilita por las patentes de EE.UU. n° 5.877.289 y 6.342.221.

El anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención también se puede derivatizar para introducir grupos funcionales que permitan la unión del o de los agentes terapéutico a través de un enlace biológicamente liberable. Por lo tanto, el anticuerpo dirigido se puede derivatizar para introducir cadenas laterales que terminan en grupos hidrazida, hidrazina, amina primaria o amina secundaria. Los agentes terapéuticos se pueden conjugar por un enlace de base de Schiff, un enlace de hidrazona o acil-hidrazona o un ligador de hidrazida (patentes de EE.UU. n° 5.474.765 y 5.762.918).

40 Se basen principalmente en dirigirse a la vasculatura o en ser antiangiogénicos, las composiciones y procedimientos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos y de diagnóstico. En términos de agentes biológicos, preferiblemente agentes terapéuticos o de diagnóstico, para usar "en combinación" con un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de acuerdo con la presente invención, el término "en combinación" se usa de manera abreviada para cubrir una variedad de realizaciones. La terminología "en combinación", a menos que se exponga específicamente de otro modo o esté claro de la terminología científica, se aplica por lo tanto a varios formatos de composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, procedimientos y primeros y segundos usos médicos.

50 Las realizaciones "combinadas" de la invención incluyen por lo tanto, por ejemplo, cuando el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención es un anticuerpo desnudo y se usa en combinación con un agente o agente terapéutico que no está unido operativamente al mismo. En dichos casos, el agente o agente terapéutico se puede usar en una forma no dirigida o dirigida. En la "forma no dirigida", el agente, en particular agentes terapéuticos, se usará en general de acuerdo a su uso estándar en la técnica. En la "forma dirigida", el agente se unirá en general operativamente a un anticuerpo distinto o región a la que está dirigido que suministra el agente o agente terapéutico a un sitio de enfermedad angiogénica o tumor. El uso de dichas formas dirigidas de los agentes biológicos, tanto de diagnóstico como terapéuticos también es bastante normal en la técnica.

En otras realizaciones "combinadas" de la invención, el anticuerpo dirigido contra VEGF humano bloqueante de

VEGFR2 de la invención es un inmunoconjugado en donde el anticuerpo está el mismo operativamente asociado o combinado con el agente o agente terapéutico. La unión operativa incluye todas las formas de unión directa e indirecta descritas en el presente documento y conocidas en la materia.

- 5 Los usos “combinados”, en particular en términos del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención en combinación con agentes terapéuticos, también incluyen composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, procedimientos, y primeros y segundos usos médicos en donde el agente terapéutico está la forma de un profármaco. En dichas realizaciones, el componente activante capaz de convertir el profármaco en la forma funcional del fármaco se puede asociar operativamente de nuevo con los anticuerpos
- 10 humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención.

En algunas realizaciones preferidas, las composiciones terapéuticas, combinaciones, productos farmacéuticos, cócteles, kits, procedimientos y primeros y segundos usos médicos serán “combinaciones de profármaco”. Como entenderán los expertos en la materia, la expresión “combinación de profármaco”, a menos que se exponga de otro

15 modo, significa que el anticuerpo de la invención se une operativamente a un componente capaz de convertir el profármaco en el fármaco activo, no que el anticuerpo se una al propio profármaco. Sin embargo, no hay requisito de que las realizaciones de profármaco de la invención se tengan que usar como combinaciones de profármaco. Por consiguiente, se pueden usar profármacos de cualquier manera que se usen en la técnica, incluyendo en ADEPT, u otras formas.

20 Por lo tanto, cuando se describen composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, procedimientos y primeros y segundos usos médicos, preferiblemente en términos de agentes de diagnóstico, y más preferiblemente agentes terapéuticos, las combinaciones incluyen anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 que son anticuerpos desnudos e inmunoconjugados, y en donde la práctica de las

25 realizaciones *in vivo* de la invención implica la administración previa, simultánea o posterior de los anticuerpos desnudos o inmunoconjugado y el agente biológico, de diagnóstico o terapéutico; siempre que, en alguna forma conjugada o no conjugada se logre proporcionar completamente alguna forma del anticuerpo y alguna forma del agente biológico, de diagnóstico o terapéutico.

- 30 Las composiciones combinadas, procedimientos y usos en particular preferidos de la invención son los que incluyen anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención y endostatina (patente de EE.UU. n° 5.854.205). Estos incluyen cuando el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención es un anticuerpo desnudo o un inmunoconjugado; y cuando un inmunoconjugado, en donde el anticuerpo dirigido contra VEGF humano bloqueante de VEGFR2 de la invención está unido a endostatina,
- 35 opcionalmente con angiostatina; en donde el procedimiento terapéutico combinado o uso comprende la administración previa, simultánea o posterior de endostatina, opcionalmente con angiostatina; siempre que, en alguna forma conjugada o no conjugada, se logre proporcionar completamente el anticuerpo, endostatina y opcionalmente la angiostatina. Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención operativamente asociados con colagenasa también se proporcionan, como la colagenasa cuando se
- 40 suministran de manera específica al tumor, producirá endostatina en el sitio, logrando beneficios similares.

Las explicaciones anteriores y otras de los efectos de la presente invención en tumores se hacen por simplicidad para explicar el modo de operación combinado, tipo de agente o agentes unidos y similar. Este procedimiento descriptivo no se debe interpretar como ya sea una subestimación o simplificación excesiva de las propiedades

45 beneficiosas de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención. Por lo tanto, se entenderá que los propios anticuerpos tienen propiedades antiangiogénicas y propiedades de neutralización de VEGF (tal como neutralización de la función de supervivencia del VEGF), que los inmunoconjugados de estos anticuerpos mantendrán estas propiedades y se combinarán con las propiedades del agente unido; y además, que el efecto combinado del anticuerpo y cualquier agente unido típicamente mejorará y/o

50 aumentará.

Por lo tanto, la invención proporciona composiciones, composiciones farmacéuticas, kits terapéuticos y cócteles medicinales que comprenden, opcionalmente en al menos una primera composición o envase, una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la

55 invención, o un fragmento de unión al antígeno o inmunoconjugado de este dicho dirigido contra VEGF; y una cantidad biológicamente eficaz de al menos un segundo agente biológico, componente o sistema.

El “al menos un segundo agente biológico, componente o sistema” a menudo será un agente, componente o sistema terapéutico o de diagnóstico, pero puede no serlo. Por ejemplo, el al menos un segundo agente biológico,

componente o sistema puede comprender componentes para la modificación del anticuerpo y/o para unir otros agentes al anticuerpo. Algunos segundos agentes biológicos, componentes o sistemas preferidos son profármacos o componentes para hacer y usar profármacos, incluyendo componentes para hacer el propio profármaco y componentes para adaptar los anticuerpos de la invención para funcionar en dichas realizaciones de profármaco o ADEPT.

Quando se incluyen agentes terapéuticos o de diagnóstico como el al menos un segundo agente biológico, componente o sistema, dichos productos terapéuticos y/o de diagnóstico serán típicamente aquellos para usar en relación con enfermedades angiogénicas. Dichos agentes son aquellos adecuados para usar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno como se describe en cualquiera de las patentes de EE.UU. n° 5.712.291, 5.753.230, 5.972.922, 5.639.757, WO 98/45331 y WO 98/16551.

Quando la enfermedad que se va a tratar es cáncer, el “al menos un segundo agente anti-cáncer” se incluirá en el kit o cóctel terapéutico. La expresión “al menos un segundo antineoplásico” se elige con respecto al anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención que es el primer antineoplásico. Los anticuerpos de la invención por lo tanto se pueden combinar con agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citoquinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis o inmunotoxinas antineoplásico o coaguligandos.

Los “agentes quimioterapéuticos”, como se usa en el presente documento, se refieren a los fármacos o agentes quimioterapéuticos clásicos usados en el tratamiento de tumores malignos. Esta expresión se usa por simplicidad, a pesar del hecho que se puedan describir de manera técnica otros compuestos como agentes quimioterapéuticos en cuanto que ejercen un efecto antineoplásico. Sin embargo, “quimioterapéutico” ha llegado a tener un significado distinto en la técnica y se está usando de acuerdo con este significado estándar. En el presente documento se describen una serie de agentes quimioterapéuticos de ejemplo. Los expertos en la materia entenderán fácilmente los usos y dosis adecuadas de agentes quimioterapéuticos, aunque las dosis se pueden reducir cuando se usan en combinación con la presente invención.

Una nueva clase de fármacos que se puede llamar también “agentes quimioterapéuticos” son agentes que inducen apoptosis. También se puede usar uno cualquiera o más de estos fármacos, incluyendo genes, vectores, construcciones de sentido contrario y ribozimas, según sea adecuado, junto con la presente invención. Los segundos agentes actualmente preferidos son agentes antiangiogénicos, tales como angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina.

Otro antineoplásico de ejemplo incluye, p. ej., neomicina, podofilotoxinas, TNF- α , antagonistas de $\alpha v \beta 3$, ionóforos de calcio, agentes inductores del flujo de calcio, y cualquier derivado o profármaco del mismo. Los fármacos antitubulina actualmente preferidos incluyen colchicina, taxol, vinblastina, vincristina, vindescina, una combretastatina o un derivado o profármaco de los mismos.

Las inmunotoxinas o coaguligandos antineoplásicos son además antineoplásicos adecuados. Las “inmunotoxinas o coaguligandos antineoplásicos”, o las construcciones de agente dirigido/agente terapéutico, se basan en agentes dirigidos, incluyendo anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a un componente al que se pueden dirigir o accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, y que se une operativamente a un agente terapéutico, incluyendo agentes citotóxicos (inmunotoxinas) y factores de coagulación (coaguligandos). Un “componente que se puede dirigir o accesible” de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, es preferiblemente un componente expresado en la superficie, accesible en la superficie o localizable en la superficie, aunque también se pueden dirigir a componentes liberados de células tumorales necróticas o dañadas de otro modo o células endoteliales vasculares, incluyendo antígenos de células tumorales citosólicas y/o nucleares.

Se pueden usar tanto agentes dirigidos de tipo anticuerpo como no anticuerpo, incluyendo factores de crecimiento, tal como VEGF y FGF; péptidos que contienen el tripéptido R-G-D, que se unen de manera específica a la vasculatura tumoral; y otros componentes dirigidos tales como anexinas y ligandos relacionados.

La inmunotoxinas o coaguligandos anticélulas tumorales pueden comprender anticuerpos ejemplificados por el grupo que consiste en anticuerpos llamados B3 (ATCC HB 10573), 260F9 (ATCC HB 8488), D612 (ATCC HB 9796) y KS 1/4, el anticuerpo KS 1/4 obtenido de una célula que comprende el vector pGKC2310 (NRRL B-18356) o el vector pG2A52 (NRRL B- 18357).

Los agentes dirigidos anticélulas tumorales que comprenden un anticuerpo, o una región de unión al antígeno del

mismo, que se unen a un componente intracelular que se libera de una célula tumoral necrótica, también están contemplados. Preferiblemente, estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a antígeno o antígenos intracelulares insolubles presentes en las células que se pueden inducir para que sean permeables, o en fantasmas celulares de sustancialmente todas las células neoplásicas y normales, pero que no están presentes ni accesibles en el exterior de las células vivas normales de un mamífero.

Las patentes de EE.UU. nº 5.019.368, 4.861.581 y 5.882.626, cada una expedida a Alan Epstein y colaboradores, se hace referencia a cada una para el propósito de describir incluso más y enseñar cómo hacer y usar los anticuerpos específicos para antígenos intracelulares que se hacen accesibles de células malignas in vivo. Los anticuerpos descritos son suficientemente específicos para componentes celulares internos de células malignas de mamífero, pero no para componentes celulares externos. Los objetivos de ejemplo incluyen histonas, pero están contemplados todos los componentes intracelulares específicamente liberados de las células tumorales necróticas.

Tras la administración a un animal o paciente con un tumor vascularizado, dichos anticuerpos localizan las células malignas en virtud del hecho que los tumores vascularizados contienen de manera natural células tumorales necróticas, debido al o a los procesos de remodelado tumoral que se producen in vivo y que hacen que al menos una parte de las células malignas se vuelvan necróticas. Además, el uso de dichos anticuerpos en combinación con otras terapias que potencian la necrosis tumoral sirve para potenciar la efectividad de la localización y la terapia subsecuente.

Estos tipos de anticuerpos por lo tanto se pueden usar para asociar directa o indirectamente con angiopoyetinas y para administrar las angiopoyetinas a células malignas necróticas dentro de tumores vascularizados, como se describe en general en el presente documento.

También se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.019.368, 4.861.581 y 5.882.626, estos anticuerpos que se pueden usar en procedimientos combinados de diagnóstico (véase más adelante) y en procedimientos para medir la eficacia de terapias antitumorales. Dichos procedimientos comprenden en general la preparación de administración de una versión marcada de los anticuerpos y la medición de la unión del anticuerpo marcado al objetivo del componente celular interno preferiblemente unido dentro del tejido necrótico. Los procedimientos de este modo forman una imagen del tejido necrótico, en donde una concentración localizada del anticuerpo es indicativa de la presencia de un tumor e indica fantasmas de células que han muerto por la terapia antitumoral.

Las inmunotoxinas o coaguligandos antiestroma tumoral comprenderán en general anticuerpos que se unen a un componente de tejido conjuntivo, un componente de membrana basal o un componente de plaquetas activado; como se ilustra por la unión a fibrina, RIBS o LIBS.

Las inmunotoxinas o coaguligandos antivasculatura tumoral pueden comprender ligandos, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen a un componente expresado en la superficie, accesible en la superficie o localizado en la superficie de los vasos transportadores de sangre, preferiblemente los vasos sanguíneos intratumorales, de un tumor vascularizado. Dichos anticuerpos incluyen aquellos que se unen a los componentes expresados en la superficie de vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado, incluyendo receptores de superficie celular de vasculatura intratumoral, tales como endoglina (anticuerpos TEC-4 y TEC-11), un receptor TGF β , E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un receptor del VEGF/VPF, un receptor de FGF, un TIE, integrina $\alpha\beta 3$, pleyotropina, endosialina y proteínas de MHC Clase II. Los anticuerpos también pueden unirse a componentes inducible por citoquinas o inducibles por coagulante de vasos sanguíneos intratumorales. Algunos agentes preferidos se unirán a aminofosfolípidos, tales como fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina.

Otras inmunotoxinas o coaguligandos antivasculatura tumoral pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen a un ligando o factor de crecimiento que se une a un receptor de superficie celular de la vasculatura intratumoral. Dichos anticuerpos incluyen los que se unen a VEGF/VPF (anticuerpos GV39 y GV97), FGF, TGF β , un ligando que se une a un TIE, una isoforma de fibronectina asociada a tumor, factor de dispersión/factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor 4 plaquetario (PF4), PDGF y TIMP. Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, también pueden unirse a un complejo de ligando:receptor o a un complejo de factor de crecimiento:receptor, pero no al ligando ni al factor de crecimiento, ni al receptor, cuando el ligando o factor de crecimiento o el receptor no está en el complejo de ligando:receptor o factor de crecimiento:receptor.

Las construcciones de agente terapéutico-anticuerpo dirigido contra célula tumoral, contra estroma tumoral o contravasculatura tumoral pueden comprender agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, fármacos antitubulina, agentes citotóxicos tales como toxinas derivadas de plantas, hongos o bacterias. A menudo

se preferirá la cadena A de ricina y la cadena A de ricina desglicosilada. Las construcciones de agente terapéutico-anticuerpo dirigido contra célula tumoral, contra estroma tumoral pueden comprender coagulantes (factores de coagulación de acción directa e indirecta) o regiones de unión del segundo anticuerpo que se unen a factores de coagulación. La asociación operativa con el factor tisular o derivados de factor tisular, tales como el factor tisular truncado, se preferirán a menudo.

En términos de composiciones, kits y/o medicamentos de la invención, las cantidades eficaces combinadas de los agentes terapéuticos pueden estar comprendidas dentro de un envase individual o medios de envase, o comprendidos dentro de distintos envases o medios de envase. Los cócteles en general se mezclarán conjuntamente para uso combinado. A menudo se preferirán agentes formulados para administración intravenosa. También se pueden incluir componentes de formación de imágenes. Los kits también pueden comprender instrucciones para usar al menos un primer anticuerpo y uno o más agentes biológicos diferentes incluidos.

Hablando en general, el al menos un segundo antineoplásico se puede administrar al animal o paciente de manera sustancialmente simultánea con un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención; tal como de una composición farmacéutica individual o de dos composiciones farmacéuticas administradas juntas.

Alternativamente, el al menos un segundo antineoplásico se puede administrar al animal o paciente en un momento secuencial a la administración del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención. "En un momento secuencial", como se usa en el presente documento, significa "escalonado", de modo que el al menos un segundo antineoplásico se administra al animal o paciente en un momento distinto a la administración del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención. En general, los dos agentes se administran en momentos efectivamente separados para permitir que los dos agentes ejerzan sus efectos terapéuticos respectivos, es decir, se administren a "intervalos de tiempo biológicamente eficaces". El al menos un segundo antineoplásico se puede administrar al animal o paciente en un tiempo biológicamente eficaz antes del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o en un momento biológicamente eficaz posterior a este producto terapéutico.

Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos para tratar un animal o paciente con un tumor vascularizado, que comprende:

(a) someter al animal o paciente a un primer tratamiento que reduce de manera sustancial la carga tumoral; y

(b) administrar posteriormente al menos un primera agente antiangiogénico al animal o paciente en una cantidad eficaz para inhibir la metástasis de cualquier célula tumoral que sobreviva; en donde el primer agente antiangiogénico es al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo; opcionalmente en donde el anticuerpo o fragmento está operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

Los primeros tratamientos preferidos incluyen la resección quirúrgica e intervención quimioterapéutica. También se pueden usar antiangiogénicos combinados.

Otros procedimientos de tratamiento para animales o pacientes con tumores vascularizados, comprenden:

(a) administrar una construcción de primer anticuerpo-agente terapéutico al animal o paciente en una cantidad eficaz para inducir necrosis tumoral sustancial; en donde la construcción de primer anticuerpo-agente terapéutico comprende un agente terapéutico operativamente unido a un primer anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un componente expresado en la superficie, accesible en la superficie o localizado en la superficie de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral; y

(b) administrar posteriormente un segundo anticuerpo al animal o paciente en una cantidad eficaz para inhibir la metástasis de cualquier célula tumoral que sobreviva; en donde el segundo anticuerpo es al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno del mismo; y además opcionalmente en donde el anticuerpo o fragmento está operativamente asociado con un segundo agente antiangiogénico.

En realizaciones en particular preferidas, los anticuerpos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención se proporcionan para usar en combinación con profármacos y en ADEPT. En dichas composiciones,

combinación, productos farmacéuticos, kits, procedimientos y usos, el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención o fragmento del mismo se modificará para proporcionar una capacidad de conversión o enzimática, o se asociará operativamente con, preferiblemente se unirá covalentemente o se conjugará con, al menos un primer agente o enzima de conversión capaz de convertir al menos un profármaco a la forma activa del fármaco.

El anticuerpo enzimático o conjugado a enzima, o fragmento, se combinará con una formulación inicialmente separada del "profármaco". El profármaco será una forma inactiva o débilmente activa de un fármaco que es el que se convierte a la forma activa del fármaco por el contacto con la capacidad enzimática, función de conversión o enzima asociada con el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención.

Por consiguiente, se proporcionan kits que comprenden, preferiblemente en composiciones y/o envases separados:

(a) una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo dirigido contra VEGF humano bloqueante de VEGFR2 de la invención o fragmento del mismo, que tiene una función enzimática, preferiblemente donde el anticuerpo o fragmento están operativamente asociado con, unido covalentemente o conjugado con al menos una primera enzima; y

(b) una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer profármaco sustancialmente inactivo que se convierte en un fármaco sustancialmente activo por la función enzimática de, o la enzima asociada con, unida a o conjugada con el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o fragmento.

La presente invención proporciona además procedimientos y usos ventajosos que comprenden:

(a) administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado una cantidad biológicamente eficaz de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento tiene una función enzimática, preferiblemente en donde el anticuerpo o fragmento está operativamente asociado con, unido covalentemente a, o conjugado con, al menos una primera enzima; en donde dicho anticuerpo o fragmento se localiza en la vasculatura, vasculatura intratumoral o estroma del tumor vascularizado después de la administración; y

(b) administrar posteriormente al animal o paciente, después de un periodo de tiempo eficaz, una cantidad biológicamente eficaz de al menos una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un profármaco sustancialmente inactivo; en donde el profármaco se convierte en un fármaco sustancialmente activo por la función enzimática de, o enzima asociada con, unida a, o conjugada con el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o fragmento, de la invención localizado dentro de la vasculatura, vasculatura intratumoral o estroma del tumor vascularizado.

En algunas realizaciones diferentes, los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención se pueden combinar con una o más agentes de diagnóstico, típicamente agentes de diagnóstico para usar en relación con enfermedades angiogénicas. Por lo tanto se incluyen en la invención una variedad de composiciones, kits y procedimientos de diagnóstico.

Más aspectos adicionales son procedimientos de diagnóstico o formación de imágenes de un sujeto, que comprenden la administración de una cantidad adecuada de un anticuerpo humano u otra proteína de la invención como se define en el presente documento al sujeto y detectar la presencia y/o cantidad y/o la localización del anticuerpo u otra proteína de la invención en el sujeto.

Las enfermedades adecuadas de las que se van a formar en imágenes o a diagnosticar de acuerdo con los usos y procedimientos descritos anteriormente incluyen cualquier enfermedad asociada con angiogénesis como se describe en otra parte del presente documento.

Se describe en el presente documento un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad asociada con angiogénesis en un mamífero, que comprende la etapa de:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo tomada de dicho mamífero con uno o más de los anticuerpos de la invención.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad asociada con angiogénesis en un mamífero, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo tomada del mamífero con uno o más de los anticuerpos de la invención;

(b) medir la presencia y/o cantidad y/o localización del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y opcionalmente

(c) comparar la presencia y/o cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo respecto a una referencia.

En los procedimientos anteriores, dicha etapa de poner en contacto se lleva a cabo en condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno. El experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones adecuadas.

En los procedimientos anteriores, se puede usar cualquier muestra adecuada de ensayo, por ejemplo células, tejidos u órganos de biopsia que se sospeche que están afectados por la enfermedad o secciones histológicas.

En algunos procedimientos anteriores, la presencia de cualquier cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo será indicativa de la presencia de la enfermedad. Preferiblemente, para que se haga un diagnóstico positivo, la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo es mayor que, preferiblemente significativamente mayor que, la cantidad encontrada en una muestra de control adecuada. Más preferiblemente, los niveles significativamente mayores son estadísticamente significativos, preferiblemente con un valor de probabilidad de <0,05. Los procedimientos adecuados para determinar la significación estadística son bien conocidos y están documentados en la técnica y se puede usar cualquiera de estos.

Las muestras de control adecuadas las puede elegir fácilmente por una persona experto en la materia, por ejemplo, en el caso de diagnóstico de una enfermedad particular, un control adecuado sería una muestra de un sujeto que no tenga esa enfermedad. Los "valores" de control adecuados también se pueden determinar fácilmente sin ejecutar una "muestra" de control en cada ensayo, p. ej., por referencia a un intervalo conocido en la técnica para sujetos normales.

Para usar en las aplicaciones de diagnóstico o formación de imágenes, los anticuerpos de la invención se pueden marcar con un marcador detectable tal como un marcador radiopaco o radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; un emisor radioactivo (p. ej., emisores α , β o γ); un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente para formación de imágenes; o un ion metálico; o un resto químico tal como biotina que se puede detectar por la unión a un resto detectable, cognado, específico, p. ej., avidina/estreptavidina marcadas. Los procedimientos para unir una etiqueta a una proteína de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, son conocidos en la técnica. Dichos marcadores detectables permiten analizar la presencia, cantidad o ubicación de los complejos de proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo.

Los marcadores detectables preferidos para usar in vivo incluyen un compuesto detectable por rayos X, tal como bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II); un ion radioactivo, tal como cobre 67 , galio 67 , galio 68 , indio 111 , indio 113 , yodo 123 , yodo 125 , yodo 131 , mercurio 197 , mercurio 203 , renio 186 , renio 188 , rubidio 97 , rubidio 103 , tecnecio $^{99\text{m}}$ o itrio 90 ; un isotipo de resonancia-espín magnético nuclear, tal como cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III), holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II), neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

La invención también incluye agentes de diagnóstico o de formación de imágenes que comprenden los anticuerpos de la invención unidos a una etiqueta que produce una señal detectable, directa o indirectamente. Las marcas adecuadas se describen en otra parte del presente documento.

La invención incluye además kits que comprenden uno o más de los anticuerpos humanos o composiciones de la invención o una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, o uno o más vectores de expresión recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención, o una o más células hospedantes o virus que comprenden los vectores de expresión recombinantes o secuencias de ácido

nucleico de la invención. Preferiblemente, dichos kits son para usar en los procedimientos y usos como se describe en el presente documento, p. ej., los procedimientos terapéuticos, de diagnóstico o de formación de imágenes como se describe en el presente documento, o son para usar en ensayos o procedimientos in vitro como se describe en el presente documento. El anticuerpo en dichos kits puede ser preferiblemente un conjugado de anticuerpo como se describe en otra parte del presente documento, p. ej., puede estar conjugado con una resto detectable o puede ser un inmunconjugado. Preferiblemente, dichos kits comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit, por ejemplo en el diagnóstico. Preferiblemente, dichos kits son para diagnosticar enfermedades asociadas con angiogénesis y comprenden opcionalmente instrucciones para usar de los componentes del kit para diagnosticar dichas enfermedades.

Los anticuerpos de la invención como se define en el presente documento también se pueden usar como herramientas moleculares para aplicaciones in vitro o in vivo y ensayos. Puesto que los anticuerpos tienen un sitio de unión al antígeno, estos pueden funcionar como miembros de parejas de unión específicas y estas moléculas se pueden usar en cualquier ensayo donde se requiera el miembro particular de la pareja de unión.

Por lo tanto, más aspectos adicionales de la invención proporcionan un reactivo que comprende un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento y el uso de dichos anticuerpos como herramientas moleculares, por ejemplo en ensayos in vitro o in vivo.

En términos de diagnóstico de cáncer y tratamiento, las composiciones, kits y procedimientos de diagnóstico y formación de imágenes de la presente invención incluyen diagnósticos in vivo e in vitro. Por ejemplo, se puede formar la imagen de un tumor vascularizado usando una cantidad diagnósticamente eficaz de un componente de diagnóstico de tumor que comprende al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, operativamente unido a un agente de formación de imágenes de diagnóstico in vivo.

La formación de imágenes tumorales se lleva a cabo preferiblemente para proporcionar una imagen del estroma y/o vasculatura de un tumor vascularizado usando un componente de diagnóstico que comprende al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de la vasculatura tumoral o estroma tumoral. Se puede usar cualquier región de unión o anticuerpo adecuado, tal como los descritos anteriormente en términos de las construcciones terapéuticas. Se proporcionarán ciertas ventajas al usar un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, marcado de manera detectable, de la construcción de la invención, en donde la imagen formada será predictiva de los sitios de unión del producto terapéutico que se va a usar.

El diagnóstico tumoral in vivo marcado de forma detectable, preferiblemente un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, puede comprender un compuesto detectable por rayos X, tal como bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II); un ion radioactivo, tal como cobre⁶⁷, galio⁶⁷, galio⁶⁸, indio¹¹¹, indio¹¹³, yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹³¹, mercurio¹⁹⁷, mercurio²⁰³, renio¹⁸⁶, renio¹⁸⁸, rubidio⁹⁷, rubidio¹⁰³, tecnecio^{99m} o itrio⁹⁰; un isotipo de resonancia-espín magnético nuclear, tal como cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III), holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II), neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

La formación previa de imágenes antes del tratamiento tumoral se puede llevar a cabo:

(a) administrando al animal o paciente una cantidad diagnósticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente de diagnóstico unido operativamente a al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral (preferiblemente) o estroma tumoral (preferiblemente), incluyendo agentes de diagnóstico operativamente unidos a una construcción de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención; y

(b) detectando posteriormente la primera región de unión marcada de manera detectable (o anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención) unida a las células tumorales, vasos sanguíneos tumorales (preferiblemente) o estroma tumoral (preferiblemente); obteniendo así una imagen del tumor, vasculatura tumoral y/o estroma tumoral.

También se puede llevar a cabo el tratamiento de cáncer:

(a) formando una imagen de un tumor vascularizado administrando a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado una cantidad de diagnóstico mínima de al menos un primer agente de unión tumoral marcado de

manera detectable, preferiblemente una construcción de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, que comprende un agente de diagnóstico operativamente unido al agente de unión tumoral o un anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, formando así una imagen detectable del tumor, vasculatura tumoral (preferiblemente), o estroma tumoral (preferiblemente); y

5

(b) administrando posteriormente al mismo animal o paciente una cantidad terapéuticamente optimizada de al menos un primer anticuerpo humano desnudo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención o construcción de agente terapéutico-anticuerpo usando dicho anticuerpo, produciendo así un efecto antitumoral.

10 Por lo tanto se proporcionan formulaciones o medicamentos de tratamiento y formación de imágenes, que comprenden en general:

(a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad diagnósticamente eficaz de un agente de unión tumoral marcado de manera detectable, preferiblemente una construcción de anticuerpo humano dirigido
15 contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, que comprende un agente detectable operativamente unido al agente de unión tumoral o anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención; y

(b) una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo humano desnudo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención o construcción de agente
20 terapéutico-anticuerpo que usa dicho anticuerpo.

La invención también proporciona kits de diagnóstico *in vitro* que comprenden al menos una primera composición o composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un agente de diagnóstico que está operativamente asociado con al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de
25 VEGFR2 de la invención, o un fragmentos de unión al antígeno del mismo.

La invención proporciona además también kits combinados en los cuales el agente de diagnóstico está destinado a usarse fuera del cuerpo, preferiblemente en relación con un ensayo llevado a cabo en una muestra biológica obtenida de un animal o paciente. Como tal, la invención proporciona kits que comprenden, en general en al menos
30 dos envases distintos, al menos una primera composición, composición farmacéutica o cóctel medicinal que comprende una cantidad biológicamente eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, o un fragmentos de unión al antígeno o inmunoconjugado de dicho anticuerpo dirigido contra VEGF; y una cantidad biológicamente eficaz de al menos un agente, componente o sistema de diagnóstico para usar *in vitro*.

35

El “agente, componente o sistema de diagnóstico para usar *in vitro*” será cualquier agente o combinación de agentes de diagnóstico que permitan el diagnóstico de una o más enfermedades que tienen un componente angiogénico. El diagnóstico *in vitro* incluye por lo tanto los adecuados para usar en la generación de información de diagnóstico o pronóstico en relación con una enfermedad o trastorno como se describe en cualquiera de las patentes de EE.UU. n°
40 5.712.291, 5.753.230, 5.972.922, 5.639.757, WO 98/45331 y WO 98/16551.

En términos de diagnosis y tratamiento de cáncer, los productos de diagnóstico *in vitro* incluirán preferiblemente un componente de diagnóstico que comprende al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral (preferiblemente) o estroma tumoral (preferiblemente)
45 operativamente unida a un “agente detectable o indicador” directa o indirectamente detectable por un ensayo de diagnóstico *in vitro*. Los “agentes detectables o indicadores” directamente detectables *in vitro* incluyen aquellos tales como radiomarcadores y agentes indicadores detectables por inmunofluorescencia.

Los “agentes detectables o indicadores” detectables indirectamente *in vitro* incluyen los que funcionan en unión con
50 agente o agentes exógenos adicionales, tales como enzimas detectables que dan un producto coloreado en contacto con un sustrato cromogénico. La detección indirecta *in vitro* también se extiende a componentes detectables o indicadores o sistemas que comprenden la primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral (preferiblemente) o estroma tumoral (preferiblemente) en combinación con al menos un anticuerpo detector que tiene inmunoespecificidad para la primera región de unión. El
55 “anticuerpo detector” es preferiblemente un “anticuerpo secundario” que se une a un agente detectable directo o indirecto, tal como un radiomarcador o enzima. Alternativamente, se puede usar un “sistema de detección de anticuerpo secundario y terciario”, que incluye un primer anticuerpo detector que tiene inmunoespecificidad para la primera región de unión en combinación con un segundo anticuerpo detector que tiene inmunoespecificidad para el primer anticuerpo detector, estando el segundo anticuerpo detector unido a un agente detectable directo o indirecto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente algunos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La figura 1 muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) y ligera (VL) de una forma scFv del clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311). Se clonó scFv por el sitio Nco/NotI en pHOG21 (3,7 Kb). Los sitios de restricción usados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MluI y NotI) están en cursivas y subrayados. La secuencia ligadora entre VH y VL está en cursivas.

La figura 2 muestra el clon de scFv EJ173/112-C11 (r84/PGN311) que se une a VEGF. La figura 2 muestra los resultados de un ensayo de ELISA para evaluar la unión del clon EJ173/112-C11 (r84), su clon madre y un anticuerpo de control positivo (B9 murino) a VEGF-A en placa. El clon EJ173/112-C11 (r84) mostró la señal más alta de unión y por lo tanto la mayor afinidad.

La figura 3 muestra que el clon de scFv EJ173/112-C11 (r84/PGN311) compite de manera eficaz con el anticuerpo 2C3 para la unión al VEGF, que se muestra por los resultados de un ensayo de ELISA de competición. Puesto que el clon EJ173/112-C11 (r84) compite de manera eficaz con el anticuerpo 2C3 por la unión al VEGF, esto muestra que el clon EJ173/112-C11 (r84) se une a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo dirigido contra VEGF 2C3 murino.

La figura 4 muestra que el clon de scFv EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se une tanto al VEGF murino como al VEGF humano.

La figura 5 muestra los resultados de un ensayo Biacore usado para evaluar la afinidad de unión de varios anticuerpos scFv al VEGF-A inmovilizado. Las curvas de unión se muestran en la figura 5 donde se puede ver que la forma de scFv EJ173/112-C11 (r84/PGN311) tiene una afinidad de unión notablemente mayor que la forma de cadena individual del clon madre (m). Otras curvas mostradas están marcadas r41, r68, r3 y r26.

La Figura 6 muestra que la IgG EJ173/112-C11 (r84/PGN311) inhibe la señalización de la célula intracelular mediada por VEGF por VEGFR2, que se muestra por los resultados de un ensayo celular in vivo en donde se muestra que la IgG EJ173/112-C11 (r84) inhibe la fosforilación de Erk1/2.

La figura 7 muestra que el clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311) reconoce la isoforma 121 truncada de VEGF (VEGF121), que se muestra por los resultados de un ensayo de ELISA.

La figura 8A y figura 8B muestran juntas que r84/PGN311 bloquea sustancialmente la interacción de VEGF con VEGFR2 pero no bloquea sustancialmente la interacción de VEGF con VEGFR1. Se incubó VEGF-biotina en presencia o ausencia de los anticuerpos indicados en los pocillos de una placa de ELISA que se recubrió con VEGFR1 soluble (figura 8A) o VEGFR2 (figura 8B). La señal del VEGF solo (VEGF) o VEGF en presencia del anticuerpo indicado se normalizó respecto al VEGF solo (100 %). Se muestra la media +/- EEM. N = 12 (4 placas idénticas con cada tratamiento realizado por triplicado). Una señal de menos de 50 % se considera inhibición sustancial y significativa de la unión.

Synagis es un anticuerpo humano dirigido contra RSV usado como un control negativo. Para comparación, también se presentan los resultados con el anticuerpo Avastin (bevacizumab) (Presta y col., 1997), que muestra que Avastin bloquea sustancialmente la interacción de VEGF tanto con VEGFR2 como con VEGFR1.

La figura 9A y la figura 9B muestran el vector de expresión de scFv. La figura 9A muestra el vector de expresión de scFv pHOG21. ApR, gen de resistencia a Ampicilina; ColE1, origen de replicación de ADN; fllG, región intergénica de fago fl; c-myc, epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 9E10; His6, seis restos de histidina; pelB, péptido señal de peptato-liasa bacteriana; P/O, operador de promotor lac tipo natural. La figura 9B muestra las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 28) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de la región codificante C-terminal.

La figura 10A, figura 10B y figura 10C muestran que los macrófagos asociados a tumor expresan VEGFR2. La figura 10A muestra la colocalización de la tinción de T014 (anticuerpo de VEGFR2) y F4/80 (marcador de macrófago) en

secciones tumorales de animales tratados con control o tratados con 2C3. La figura 10A muestra que 2C3 disminuye la infiltración de macrófagos. Sin embargo, tanto los grupos de control como de 2C3 demuestran la colocalización de VEGFR2 y marcadores de macrófagos. La figura 10B muestra el número de células doblemente positivas para uno de tres marcadores de macrófago diferentes y VEGFR2. La figura 10C usa dos anticuerpos diferentes contra VEGFR2 para mostrar que los macrófagos peritoneales de animales que tienen tumor expresan VEGFR2.

La figura 11 muestra que r84/PGN311 inhibe el crecimiento de tumores MDA-MB-231. La figura 11 muestra resultados de un estudio que usa el modelo de tumor de cáncer de mama MDA-MB-231 in vivo (de ratón) y el efecto de r84, Avastin o solución salina (control) en el volumen tumoral. Se muestra el volumen tumoral medio $\pm$ EEM. Los ratones tratados con Avastin y r84 tienen volúmenes tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con control.

La figura 12 muestra resultados del mismo estudio mostrado en la figura 11, excepto que la figura 12 muestra la relación de peso tumoral/peso corporal para animales individuales en cada grupo. Ratones tratados con Avastin y r84/PGN311 tienen relaciones de peso tumoral/peso corporal que son significativamente más pequeñas que los animales tratados con control.

La figura 13 muestra que r84/PGN311 inhibe el crecimiento de tumores A673. La figura 13 muestra resultados de un estudio que usa un modelo de tumor A673 in vivo (ratón) y el efecto de r84, 2C3 o un anticuerpo de control (Synagis - humano dirigido contra RSV) en el volumen tumoral. Se muestra el volumen tumoral medio $\pm$ EEM. Los ratones tratados con 2C3 y r84 tienen volúmenes tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con control. Por lo tanto 2C3 y r84 son eficaces en el control del crecimiento de tumores A673.

La figura 14 muestra que r84/PGN311 reduce significativamente la infiltración de macrófagos asociados a tumor. Se tomaron tumores de ratones con células tumorales MDA-MB-231 y se seccionaron y tiñeron con anticuerpos contra un marcador de macrófagos (Mac-3). Se analizaron tres tumores de los animales de control y tres tumores cada uno de los animales tratados con r84 y 2C3 y se estudiaron 5 imágenes de cada tumor. La figura 14 muestra que los tumores de animales tratados con r84 y 2C3 mostraron expresión significativamente reducida del marcador de macrófagos Mac-3, y que r84 tiene un efecto más pronunciado que 2C3 ($p < 0,01$ para r84).

La figura 15 muestra que r84/PGN311 reduce significativamente la densidad de microvasos en tumores de modelo animal MDA-MB-231. Se tomaron tumores de ratones con células tumorales MDA-MB-231 y se seccionaron y tiñeron con anticuerpos contra células endoteliales de ratón (MECA-32). Se analizaron tres tumores de los animales de control y tres tumores cada uno de animales tratados con r84 y 2C3 y se estudiaron 5 imágenes de cada tumor. La figura 15 muestra que los tumores de los animales tratados con r84 y 2C3 mostraron un número significativamente reducido de vasos sanguíneos/campo de alta potencia (MECA-32, $p < 0,0001$).

La figura 16A y figura 16B muestran que r84/PGN311 bloquea de manera selectiva la ruta de VEGFR2. La figura 16A muestra que r84/PGN311 inhibe la fosforilación estimulada por VEGF (+VEGF) de Erk1/2 (pERK1/2) y PLC- γ (pPLC- γ) en células que expresan VEGFR2 (HDMEC). El control positivo Avastin también inhibe la fosforilación estimulada por VEGF de Erk1/2 y PLC- γ . La figura 16B muestra que r84/PGN311 no inhibe la fosforilación estimulada por VEGF de VEGFR1 en células que expresan VEGFR1 (PAE Flt) en tanto que el control positivo, Avastin, inhibe la fosforilación de VEGFR1.

Las figura 17A, figura 17B, figura 17C y figura 17D muestran que r84/PGN311 conduce a una reducción significativa en el crecimiento de tumores producidos por líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas. La figura 17A, figura 17B, figura 17C y figura 17D muestran resultados de estudios que usan un modelo de ratón in vivo y cuatro líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas diferentes, H460 (figura 17A), H1299 (figura 17B), H358 (figura 17C) y A549 (figura 17D). Se muestra el efecto de r84/PGN311, Avastin o un anticuerpo de control (Synagis o XTL) en el peso tumoral (se muestra peso medio de tumores $\pm$ EEM). Los ratones tratados con r84/PGN311 y Avastin tienen pesos tumorales medios que son significativamente menores que los animales tratados con control. r84/PGN311 y Avastin por lo tanto son eficaces en el control del crecimiento de las líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas. r84/PGN311 funciona mejor que Avastin al menos en los modelos H460 (figura 17A), H1299 (figura 17B) y el A549 (figura 17D). r84 es significativamente mejor que Avastin en el modelo A549 (figura 17D).

La figura 18A, figura 18B y figura 18C muestran que la densidad de vasos linfáticos en tumores tratados con r84 es significativamente menor que en los tumores de control. La figura 18A (seis paneles) es una tinción de inmunofluorescencia de secciones de tumor MDA-MB-231 congeladas que muestran los marcadores linfáticos,

podoplanina (verde), Prox1 (rojo) y las imágenes fusionadas, en los tumores tratados con control (paneles superiores) y tratados con r84 (paneles inferiores). La figura 18 B (dos paneles) muestra secciones de tumor MDA-MB-231 teñidas para LYVE-1 en tumores tratados con control (panel superior) y tratados con r84 (panel inferior). El patrón de tinción de LYVE-1 (figura 18B) es similar al de la podoplanina y Prox1 (figura 18A). El área completa de cada sección tumoral con LYVE-1 teñido se examinó con pocos aumentos y se determinó el porcentaje de área positiva para LYVE-1 para cada campo usando el software de formación de imágenes NIS-Elements (figura 18C). Los diez campos con el área de porcentaje positivo mayor para LYVE-1 se promediaron juntos para producir una puntuación final para cada tumor y se probaron medias de grupo para la significación por una prueba t de Student para muestras no pareadas. El porcentaje de área positiva para LYVE-1 de tumores de control ($7,3 \pm 1,013$; $n = 6$) era significativamente mayor que en los tumores tratados con r84 ($2,23 \pm 0,986$; $n = 5$), con $P = 0,0042$.

La figura 19 muestra que r84 en formatos de IgG completamente humanos y quiméricos murinos se une tanto a VEGF murino como VEGF humano. El VEGF humano ($0,5 \mu\text{g/ml}$, R&D) o VEGF de ratón ($0,5 \mu\text{g/ml}$, Sigma) se aplicó como revestimiento en el fondo de placas de 96 pocillos. Los pocillos se bloquearon y después se incubaron con la concentración indicada de r84 humano (líneas azules) o r84 quimérico de ratón (líneas verdes). Se detectó el anticuerpo unido a los pocillos mediante incubación con anticuerpo dirigido contra Fc humano conjugado o dirigido contra IgG de ratón conjugado con HRP. Se presenta la absorbancia promedio.

La figura 20A y figura 20B muestran que r84/PGN311 inhibe potencialmente la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR2. Se usaron células que expresan HDMEC (figura 20A) y PAE KDR (figura 20B) en los ensayos con Transwell. Las células no se estimularon (NS), o se expusieron al VEGF a 100 ng/ml para estimular la migración (VEGF), y se ensayó la capacidad de un exceso molar de 500 veces de los anticuerpos r84, Avastin (Avas) o de control (Cntl) (formato de IgG) para inhibir la migración inducida por el VEGF. El VEGF induce migración en comparación con células no estimuladas ($p < 0,01$). r84 y Avastin inhiben la migración inducida por el VEGF (***, $p < 0,0001$ frente a VEGF solo).

La figura 21 muestra que r84/PGN311 no inhibe la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR1. Las células que expresan PAE Flt1 no se estimularon (NS), o se expusieron al VEGF (VEGF) para estimular la migración (VEGF), y se ensayó la capacidad de los anticuerpos r84, Avastin (Avas) o de control (Cntl) para inhibir la migración inducida por el VEGF. El VEGF induce migración en comparación con células no estimuladas. Avastin inhibe significativamente la migración inducida por VEGF mientras que r84 no lo hace. Por lo tanto, la figura 21 muestra que r84/PGN311 no inhibe la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR1. PAE Flt1, células endoteliales que expresan exclusivamente VEGFR1, se privaron de suero durante 24 horas y luego se pusieron en placa en medio exento de suero en inserciones de Transwell (tamaño de poros $8 \mu\text{m}$, 5.000 células/inserto). La migración a la parte inferior de la membrana se estimuló añadiendo lo siguiente al pocillo debajo del inserto: medio exento de suero (NS); VEGF (100 ng/ml); VEGF + IgG de control (Cntl); VEGF + Avastin (Avastin); VEGF + r84 (r84). Se dejó que las células migraran durante 24 horas momento donde se retiraron las membranas, las células se retiraron de la superficie superior de la membrana, se fijaron, se tiñeron con DAPI. Los núcleos teñidos con DAPI en la parte inferior de la membrana después se contaron por microscopía de fluorescencia y se cuantificaron usando software (Elements, Nikon). *, $p < 0,05$ r84 frente a Avastin; **, $p < 0,01$ Avastin frente a de control.

La figura 22 muestra que r84/PGN311 reduce notablemente el crecimiento de células tumorales pancreáticas Panc1 en ratones. Se administró a ratones que llevan células de adenocarcinoma pancreático Panc1 IgG r84/PGN311 o Synagis (de control negativo). Los volúmenes tumorales se representan frente al transcurso de tiempo del tratamiento. Por lo tanto, la figura 22 muestra que r84/PGN311 reduce el crecimiento de xenoinjertos tumorales, pancreáticos, humanos, subcutáneos. Se inyectaron células tumorales Panc1 por vía subcutánea en ratones SCID (2×10^6 células/animal) el día 0. Los animales se trataron empezando el día 1, 2x/semana, con $500 \mu\text{g}$ de una IgG de de control (Synagis) o r84. El volumen tumoral se siguió a lo largo del tiempo usando calibres. Se muestra el volumen tumoral medio (EEM) ($n=5/\text{grupo}$) frente al día después de inyección de células tumorales (TCI).

La figura 23 muestra que la versión quimérica de ratón de r84/PGN311 prolonga la supervivencia de ratones que llevan tumores mamarios 4T1 singénicos. Se inyectaron tumores 4T1 murinos de manera ortotópica en ratones Balb/C ($n=8$ ratones por grupo). Se administró ya sea la versión quimérica de ratón de r84/PGN311 (mcr84, línea roja) o control (Control, línea negra) por inyección i.p. dos veces por semana empezando el día 12 y continuando durante 3 semanas. r84/PGN311 prolongó la supervivencia en comparación con el control.

La figura 24 muestra el nivel de VEGF de ratón en sueros de ratones que llevan tumor que se trataron con IgG de control, avastin, 2C3 o r84 (como se indica). Se recogieron los sueros y se ensayaron por ELISA para el nivel de

VEGF de ratón usando un kit de R&D systems. Además, se pre-clarifó una parte alícuota de sueros de ratones tratados con r84 con perlas de Proteína G. También se ensayó el líquido sobrenadante de los sueros clarificados de Proteína G (r84 supe).

- 5 La figura 25 muestra que r84, y en un grado menor Avastin (bev), disminuye la infiltración de células CDR11b+/Gr1+ en tumores MDA-MB-231 in vivo, mientras que 2C3 no lo hace. La reducción para r84 es 39 %. El ANOVA de una vía indica que la menor infiltración observada con animales tratados con r84, pero no con animales tratados con 2C3 o Avastin (bev), es estadísticamente diferente de los animales tratados con control (designado **, $p < 0,01$).

10 Descripción de realizaciones ilustrativas

Los tumores sólidos y carcinomas dan cuenta de más de 90 % de todos los cánceres en el hombre. Aunque se ha investigado el uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas en la terapia de linfomas y leucemias, estos agentes han sido decepcionantemente ineficaces en ensayos clínicos contra carcinomas y otros tumores sólidos (Abrams y Oldham, 1985). Una razón principal para la ineficacia de los tratamientos basados en anticuerpos es que las macromoléculas no son fácilmente transportadas a los tumores sólidos. Incluso una vez dentro de una masa tumoral, estas moléculas no se distribuyen uniformemente debido a la presencia de uniones estrechas entre las células tumorales, estroma fibroso, gradientes de presión intersticial y barreras del sitio de unión (Dvorak y col., 1991a).

- 20 Al desarrollar nuevas estrategias para tratar tumores sólidos, los procedimientos que implican dirigirse a la vasculatura del tumor, en lugar de a las células tumorales, ofrecen ventajas distintas. Una distribución o bloqueo eficaz de los vasos tumorales detiene el flujo sanguíneo a través del tumor y da como resultado una avalancha de muerte de células tumorales. Las construcciones de anticuerpo-toxina y anticuerpo-coagulante ya se han usado eficazmente en el direccionamiento y la destrucción específicos de vasos tumorales produciendo necrosis tumoral (Burrows y col, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; documentos WO 93/17715; WO 96/01653; patentes de EE.UU. nº 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.051.230; 6.004.555; 6.093.399).

- 30 Cuando se usan anticuerpos, factores de crecimiento u otros ligandos de unión para suministrar de manera específica un coagulante a la vasculatura tumoral, estos agentes se llaman "coaguligandos". Un coagulante actualmente preferido para usar en los coaguligandos es el factor tisular truncado (tTF) (Huang y col, 1997; WO 96/01653; patente de EE.UU. nº 5.877.289). El TF es el iniciador principal de la coagulación sanguínea. En los sitios de lesión el Factor VII/VIIa en la sangre se pone en contacto con, y se une al TF en células en tejidos perivascuales. El complejo TF:VIIa, en presencia de la superficie de fosfolípidos, activa los factores IX y X. Esto a su vez, conduce a la formación de trombina y fibrina y finalmente, un coagulo sanguíneo.

- Se han descrito una variedad de moléculas objetivo adecuadas que están disponibles en el endotelio tumoral, pero en gran medida ausentes en el endotelio normal. Por ejemplo se pueden usar objetivos expresados, tales como endoglina, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor del VEGF/VPF, un receptor de FGF, $\alpha_v\beta_3$ integrina, pleyotropina o endosialina (patentes de EE.UU. nº 5.855.866; 5.877.289 y 6.004.555; Burrows y col, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; Huang y col, 1997).

- Otros objetivos inducibles por el entorno tumoral natural o después de intervención por el hombre también son entidades direccionables, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.776.427 y 6.036.955). Cuando se usa junto con supresión previa en tejidos normales e inducción vascular de tumor, los antígenos de MHC Clase II también se pueden usar como objetivos (patentes de EE.UU. nº 5.776.427; 6.004.554 y 6.036.955).

- Los objetivos adsorbidos son otro grupo adecuado, tal como VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se une a un TIE o una isoforma de fibronectina asociada a tumor (Patentes de EE.UU. nº 5.877.289 y 5.965.132). Las isoformas de fibronectina son ligandos que se unen a la familia de receptores de integrinas. Las isoformas de fibronectina asociadas a tumor son componentes direccionables tanto de la vasculatura tumoral como del estroma tumoral.

- Un marcador actualmente preferido para dichas aplicaciones clínicas de direccionamiento es VEGF asociado a receptor. De hecho, los montajes de los complejos de VEGF:receptor son uno de los marcadores más específicos de la vasculatura tumoral observados hasta la fecha (patentes de EE.UU. nº 5.877.289; 5.965.132 y 6.051.230; Lin-Ke y col., 1996; Dvorak y col, 1991b).

El complejo de VEGF:receptor presenta un objetivo atractivo para el suministro específico de fármacos u otros

efectores al endotelio tumoral, puesto que los tumores son ricos en citoquinas y factores de crecimiento y puesto que los receptores de VEGF son regulados por aumento en las condiciones hipóxicas que se encuentran en la mayoría de los tumores sólidos (Mazure y col, 1996; Forsythe y col, 1996; Waltenberger y col., 1996; Gerber y col, 1997; Kremer y col, 1997). La regulación por aumento tanto del ligando como de su receptor específicamente en el microentorno tumoral conduce a una alta concentración de receptor ocupado en el endotelio vascular tumoral, en comparación con el endotelio en tejido normal (patentes de EE.UU. nº 5.877.289 y 5.965.132). Dvorak y colaboradores también mostraron que anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el extremo N del VEGF teñían selectivamente los vasos sanguíneos tumorales después de la inyección en ratones que llevan tumores singénicos (Lin-Ke y col, 1996).

10

La función del VEGF como un objetivo para la intervención clínica no se limita a terapias de inmunotoxinas o coaguligandos. En realidad, el VEGF es uno de los factores claves implicados en la angiogénesis de tumores sólidos (Ferrara, 1995; Potgens y col, 1995), siendo tanto un potente agente de permeabilidad (Senger y col, 1983; Senger y col, 1990; Senger y col, 1986) como un mitógeno de células endoteliales (Keck y col, 1989; Connolly y col, 1989; Thomas, 1996). La conexión entre el VEGF y la angiogénesis ha conducido a propuestas de diferentes estrategias terapéuticas dirigidas a la intervención de VEGF (Siemeister y col, 1998).

15

A. VEGF y receptores de VEGF

La isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, llamado de manera abreviada "VEGF" en la presente solicitud) es una citoquina multifuncional que es inducida por hipoxia y mutaciones oncogénicas. El VEGF es un estimulante principal del desarrollo y mantenimiento de una red vascular en la embriogénesis. Funciona como un potente agente inductor de permeabilidad, un agente quimiotáctico de células endoteliales, un factor de supervivencia endotelial, un factor de proliferación de células endoteliales (Thomas, 1996; Neufeld y col, 1999). Su actividad es necesaria para el desarrollo embrionario normal (Fong y col, 1995; Shalaby y col, 1995), puesto que la ruptura dirigida de uno o ambos alelos del VEGF da como resultado letalidad embrionaria (Carmeliet y col, 1996; Ferrara y col., 1996).

25

El VEGF es un factor importante que impulsa la angiogénesis o vasculogénesis en numerosos procesos fisiológicos y patológicos incluyendo la curación de heridas (Frank y col, 1995; Burke y col, 1995), retinopatía diabética (Alon y col, 1995; Malecaze y col, 1994), psoriasis (Detmar y col, 1994), aterosclerosis (Inoue y col, 1998), artritis reumatoide (Harada y col, 1998; Nagashima y col, 1999), crecimiento de tumores sólidos (Plate y col, 1994; Claffey y col, 1996).

30

Una amplia variedad de células y tejidos producen VEGF, que existe en al menos cinco isoformas (121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos) que son variantes de empalme codificadas por el mismo gen (Houck y col, 1991; Ferrara y col, 1991; Tischer y col, 1991). Las dos isoformas más pequeñas, 121 y 165, son segregadas de células (Houck y col, 1991; Anthony y col, 1994). El VEGF segregado es un dímero obligado de entre 38-46 kDa donde los monómeros están unidos por dos enlaces de disulfuro.

35

Los dímeros del VEGF se unen con alta afinidad a dos receptores bien caracterizados, VEGFR1 (FLT-1) y VEGFR2 (KDR/Flk-1), que son expresados selectivamente en células endoteliales (Flt-1 y Flk-1 son los homólogos de ratón). La K_d de la unión del VEGF al VEGFR1 y VEGFR2 es de 15-100 pM y 400- 800 pM, respectivamente (Terman y col, 1994). Una tercera proteína de superficie celular, recién identificada, la neuropilina-1, también se une al VEGF con alta afinidad (Olander y col, 1991; De Vries y col., 1992; Terman y col., 1992; Soker y col., 1998).

45

VEGFR1 y VEGFR2 son miembros de la familia de tirosina quinasas receptores de tipo III (RTK III) que se caracteriza por siete repeticiones extracelulares similares a IgG, un solo dominio transmembrana de extensión, y un dominio de tirosina quinasa de división intracelular (Mustonen y Alitalo, 1995). Hasta hace muy poco, se pensaba que VEGFR1 y VEGFR2 eran expresados casi exclusivamente en células endoteliales (Mustonen y Alitalo, 1995). Aunque se ha descrito que VEGFR1 y VEGFR2 tienen diferentes funciones con respecto a la estimulación de la proliferación, migración y diferenciación de células endoteliales (Waltenberger y col, 1994; Guo y col, 1995), la función precisa que tiene cada receptor en la biología del VEGF y en la homeostasis de células endoteliales no se ha definido claramente antes de la presente invención.

50

55

Estudios recientes que usan los ratones con inactivación génica han mostrado que cada uno de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 es esencial para la vasculogénesis, angiogénesis y desarrollo embrionario (Fong y col, 1995; Shalaby y col, 1995; Hiratsuka y col, 1998). En estudios de inactivaciones génicas letales, los fenotipos asociados con la falta de cada receptor eran distintos. La alteración dirigida de VEGFR2 daba como resultado un embrión que carecía de

diferenciación de células endoteliales y pudo formar islotes sanguíneos del saco vitelino o pasaban por la vasculogénesis (Shalaby y col., 1995). Los mutantes nulos en VEGFR1 mostraron vasculogénesis deteriorada, ensamblaje desorganizado de células endoteliales, y vasos sanguíneos dilatados (Fong y col., 1995; Hiratsuka y col., 1998). El VEGFR1 tiene evidentemente un papel biológico vital. El VEGFR1 tiene una mayor afinidad por el VEGF que por el VEGFR2, aunque tiene una menor actividad de tirosina quinasa. Esto sugiere que el dominio extracelular del VEGFR1 es en particular importante. En esta hipótesis estaba fuertemente apoyada por los resultados de estudios en ratones con inactivación génica en los que se eliminó el dominio de tirosina quinasa de VEGFR1 mientras que se dejó intacto el dominio de unión del VEGF (Hiratsuka y col., 1998). Los embriones deficientes en VEGFR1-tirosina quinasa desarrollaron vasos sanguíneos normales y sobrevivieron hasta el final (Hiratsuka y col., 1998).

Además de las inactivaciones génicas tempranas (Fong y col., 1995; Shalaby y col., 1995), los estudios de Hiratsuka y col. (1998) indican que VEGFR1 tiene una función biológica vital. Sin embargo, la señalización de tirosina quinasa no parece ser un factor crítico. Es interesante señalar que los macrófagos de los ratones con inactivación génica de VEGFR1 no presentaban quimiotaxis inducida por VEGF (Hiratsuka y col., 1998), implicando de este modo que VEGFR1 es el receptor responsable de mediar esta importante respuesta biológica al VEGF.

Algunos grupos han descrito que VEGFR2 es el receptor de señalización dominante en la mitogénesis inducida por VEGF, y permeabilidad (Waltenberger y col., 1994; Zachary, 1998; Korpelainen y Alitalo, 1998). El papel del VEGFR1 en la función de células endoteliales es mucho menos claro, aunque se han documentado funciones en la migración y quimiotaxis de macrófagos en los estudios de Hiratsuka y col. (1998) descritos antes.

Clauss y col. (1996) también describieron que el VEGFR1 tiene funciones importantes en la activación y quimiotaxis de monocitos. De hecho, las células de linaje de macrófagos/monocitos expresan solo VEGFR1, que es el receptor responsable de mediar el reclutamiento de monocitos y la actividad procoagulante (Clauss y col., 1996). La unión del VEGF al VEGFR1 en monocitos y macrófagos también actúa aumentando el calcio intracelular e induciendo fosforilación de tirosina (Clauss y col., 1996).

La unión del dímero de VEGF al receptor del VEGF se cree que induce la dimerización del receptor. La dimerización del receptor produce entonces la autotransfosforilación de restos específicos de tirosina, Y801 y Y1175, y Y1213 y Y1333 en el lado intracelular del VEGFR2 y VEGFR1, respectivamente. Esto conduce a una cascada de transducción de señales, que incluye la activación de fosfolipasa C γ (PLC γ) y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y un incremento en iones de calcio intracelulares (Hood y Meininger, 1998; Hood y col., 1998; Kroll y Waltenberger, 1998).

Los sucesos intracelulares adicionales en la dirección 3' en la señalización inducida por VEGF son menos claros, aunque una serie de grupos han mostrado que se produce óxido nítrico (NO) después de la activación por VEGF de VEGFR2 (Hood y Meininger, 1998; Hood y col., 1998; Kroll y Waltenberger, 1998). La activación de VEGFR2, pero no de VEGFR1, por el VEGF también se ha mostrado que activa Src y la cascada de Ras-MAP quinasa, incluyendo las MAP quinasa, ERK1 y ERK2 (Waltenberger y col., 1994, 1996; Kroll y Waltenberger, 1997).

El papel del VEGFR1 en la función de células endoteliales está mucho menos claro, en particular puesto que ratones deficientes en tirosina quinasa F1t-1 son viables y desarrollan vasos normales (Hiratsuka y col., 1998). Se ha sugerido que el papel biológico principal del VEGFR1 en el endotelio es como una molécula que se une al ligando no señalizadora, o receptor "señuelo" que puede ser necesaria para presentar VEGF al VEGFR2.

La conexión entre el VEGF y condiciones angiogénicas patológicas ha impulsado varios intentos de bloquear la actividad del VEGF. Estos incluyen el desarrollo de ciertos anticuerpos neutralizantes contra el VEGF (Kim y col., 1992; Presta y col., 1997; Sioussat y col., 1993; Kondo y col., 1993; Asano y col., 1995). También se han descrito anticuerpos contra receptores del VEGF, tal como se describen en las patentes de EE.UU. n° 5.840.301 y 5.874.542 y, subsiguiente a la presente invención, en WO 99/40118. Las patentes de EE.UU. n° 5.840.301 y 5.874.542 sugieren en realidad que el bloqueo de los receptores del VEGF en lugar del propio VEGF es ventajoso por varias razones.

También se han descrito construcciones de receptor soluble (Kendall y Thomas, 1993; Aiello y col., 1995; Lin y col., 1998; Millauer y col., 1996), inhibidores tirosina quinasa (Siemeister y col., 1998), estrategias antisentido, aptámeros y ribozimas de ARN contra VEGF o receptores de VEGF (Saleh y col., 1996; Cheng y col., 1996).

B. Anticuerpos dirigidos contra VEGF

B1. Propiedades del Anticuerpo

La aplicación de varios procedimientos inhibidores también ha mostrado que es al menos algo eficaz ya sea en el bloque de la angiogénesis y/o en la supresión del crecimiento tumoral al interferir con la señalización de VEGF. De hecho, se ha mostrado con los anticuerpos monoclonales contra VEGF inhiben el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos y la formación de ascitis en ratones (Kim y col, 1993; Asano y col, 1995; 1998; Mesiano y col, 1998; Luo y col, 1998a; 1998b; Borgstrom y col, 1996; 1998).

El anticuerpo A4.6.1 es un anticuerpo dirigido contra VEGF de alta afinidad capaz de bloquear la unión del VEGF tanto a VEGFR1 como a VEGFR2 (Kim y col, 1992; Wiesmann y col, 1997; Muller y col, 1998). La mutagénesis por barrido con alanina y la cristalografía de rayos X del VEGF unido por el fragmento Fab de A4.6.1 mostró que el epítipo en VEGF al cual se une A4.6.1 está centrado alrededor de los aminoácidos 89-94. Estos datos estructurales demuestran que A4.6.1 inhibe de manera competitiva la unión del VEGF al VEGFR2, pero inhibe la unión del VEGF al VEGFR1 lo más probable por impedimento estérico (Muller y col, 1998; Keyt y col, 1996).

A4.6.1 es el anticuerpo dirigido contra VEGF neutralizante más ampliamente usado en la literatura hasta la fecha. Se ha mostrado que inhibe el crecimiento y permeabilidad vascular inducida por el VEGF de una variedad de tumores humanos en ratones (Brem, 1998; Baca y col, 1997; Presta y col, 1997; Mordenti y col, 1999; Borgstrom y col, 1999; Ryan y col, 1999; Lin y col, 1999). A4.6.1 también inhibe la formación de ascitis en un modelo de ratón de carcinoma ovárico humano bien caracterizado y la diseminación tumoral en un modelo de ratón de metástasis. Se ha humanizado A4.6.1 por técnicas de presentación de fagos monovalentes (Brem, 1998; Baca y col, 1997; Presta y col, 1997). El anticuerpo humanizado resultante llamado Avastin (bevacizumab), se ha aprobado para uso clínico (Hurwitz y col, 2004).

A pesar del éxito en la técnica con anticuerpos neutralizantes contra el VEGF, los presentes autores de la invención se dieron cuenta que nuevos anticuerpos, en particular anticuerpos humanos con un modo de interacción con VEGFR1 (FLT-1) y/o VEGFR2 (KDR/Flk-1) más precisamente definido, serían beneficiosos por una variedad de razones. Por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra VEGF que bloquean selectivamente la interacción del VEGF con solo uno de los dos receptores del VEGF, permitiría una disección más precisa de las rutas activadas por el VEGF en células que expresan tanto VEGFR1 como VEGFR2.

Los autores de la presente invención creyeron que anticuerpos humanos de especificidad de epítipo definida que bloquearan la unión del VEGF a solo un receptor (VEGFR2) tendrían beneficios clínicos. Los estudios con ratones con inactivación génica de Hiratsuka y col. (1998) mostraron que tanto VEGFR1 como VEGFR2 tienen funciones biológicas importantes. Antes de la presente invención, las oportunidades realistas para la intervención terapéutica dirigida a inhibir los efectos mediados por el VEGF solo a través de uno de los dos receptores fueron impedidas por la falta de agentes inhibidores, adaptados, eficaces, optimizados para administración humana.

Dada la necesidad de anticuerpos humanos específicos terapéuticos que bloqueen la angiogénesis, se han identificado anticuerpos humanos que son reactivos contra un epítipo en VEGF que bloquea específica y sustancialmente su interacción con el receptor 2 de VEGF (VEGFR2, KDR/Flk-1), pero no bloquea de manera sustancial su interacción con el receptor 1 de VEGF (VEGFR1, Flt-1).

Los autores de la presente invención desarrollaron primero una variedad de anticuerpos dirigido contra VEGF completamente humanos que competían con el anticuerpo murino 2C3 por la unión al VEGF. Se seleccionaron una serie de clones de anticuerpo que presentaban alta afinidad para VEGF y que mostraban alteración selectiva de la interacción entre VEGF y VEGFR2 y no entre VEGF y VEGFR1, para el análisis adicional. Finalmente uno de estos clones, llamado un "clon madre", se sometió a maduración, después de lo cual se seleccionó un nuevo clon que presentaba mejoras significativas e importantes adicionales, por ejemplo, una mejor afinidad de unión tanto al VEGF humano como VEGF de ratón, una mayor estabilidad en el suero y una tendencia reducida a formar agregados en el formato scFv. Este anticuerpo se llamó r84 (y PGN311) y presenta afinidad de unión al VEGF, con una Kd en un formato de IgG del orden de 7 nM o menos, que está dentro del intervalo mostrado que es eficaz en terapia humana.

Adicionalmente, se muestra en el presente documento que el anticuerpo r84 reduce significativamente el volumen tumoral/crecimiento tumoral en varios modelos de tumor in vivo aceptados en la técnica (específicamente, el modelo de tumor de rhabdomyosarcoma A673, del modelo de tumor de células de cáncer de mama MDA-MB 231, varios modelos de cáncer de pulmón humano de células no pequeñas, el modelo de tumor de células de cáncer pancreático Panc 1 y el modelo de tumor mamario 4T1). De manera notable, los resultados con r84 son al menos tan buenos como el anticuerpo dirigido contra VEGF humanizado llamado Avastin, que se ha aprobado para uso clínico.

Un anticuerpo completamente humano tal como r84 proporcionará ventajas con respecto al anticuerpo humanizado disponible. Además, r84 tiene la propiedad ventajosa de unirse al VEGF de ratón y al VEGF humano. La capacidad para unirse al VEGF de ratón es una ventaja importante que presenta el anticuerpo r84 con respecto a 2C3 y Avastin. Además, los resultados del modelo de tumor MDA-MB 231 también muestran que r84 reduce significativamente la infiltración de macrófagos asociados a tumor, que ahora se sabe que tienen una función positiva en el desarrollo y metástasis de cáncer y por lo tanto que son perjudiciales para los pacientes. En relación con esto, se ha mostrado que r84 reduce significativamente la expresión del marcador de macrófagos Mac-3 ($p < 0,01$). Además, los resultados del modelo de tumor MDA-MB 231 muestran que r84 reduce significativamente ($p < 0,0001$) el número de vasos sanguíneos en tumores y por lo tanto reduce significativamente la densidad de microvasos (MVD) en tumores.

También se ha mostrado que r84 inhibe significativamente la migración inducida por el VEGF de células que expresan VEGFR2 y reduce significativamente la densidad de vasos linfáticos en tumores MDAMB231. El efecto en la densidad de vasos linfáticos respalda el uso de los anticuerpos humanos de la invención para inhibir la linfangiogénesis.

Una propiedad ventajosa adicional mostrada por r84 es la capacidad para reducir significativamente la infiltración de células supresoras derivadas de mieloides, en particular células CD11b+/Gr1+, en tumores. Además, esta propiedad no la muestra el anticuerpo 2C3 y Avastin solo en un nivel muy reducido. Por lo tanto, los estudios adicionales en ratones que llevan el tumor MDA-MB-231 han mostrado que significativamente menos células doble positivas CD11b/Gr1 se infiltran en tumores en animales tratados con r84 en oposición al control. En estudios comparativos, ni el anticuerpo 2C3 ni Avastin mostraron una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+, aunque se midió algo de reducción en animales tratados con Avastin. La reducción en el número de células doble positivas observada en animales tratados con r84/PGN311 es de 39 % (figura 25).

La menor infiltración de células supresoras derivadas de mieloides CD11b+/Gr1+ es de interés especial, puesto que las células que expresan ambos marcadores se han asociado recientemente con la mediación de capacidad de refracción tumoral a la terapia con anticuerpo dirigido contra VEGF (Shojaei y col., 2007). Las células supresoras derivadas de mieloides (CD11b+/Gr1+) también son un importante contribuyente al progreso tumoral. En el microentorno tumoral, estas células segregan mediadores inmunosupresores e inducen disfunción de linfocitos T (Gabrilovich y col., 2001; Serafini y col., 2004).

Puesto que las células CD11b+/Gr1+ están asociadas con la capacidad de refracción tumoral a terapia con anticuerpo dirigido contra VEGF y contribuyen al progreso del tumor, el efecto de r84/PGN311 para reducir la infiltración o reclutamiento de estas células en tumores tiene claramente una importancia potencial para aplicaciones terapéuticas de r84, en particular aplicaciones terapéuticas relacionadas con el tratamiento de enfermedades angiogénicas, incluyendo cáncer.

En realidad, como muestran los resultados del presente documento que la infiltración tumoral de células CD11b+/Gr1+ es menos pronunciada/significativamente menor en los animales tratados con r84/PGN311, sugiere que el tratamiento con r84 probablemente es menos propenso al desarrollo de resistencia a fármacos o capacidad de refracción a terapia con anticuerpo dirigido contra VEGF que el tratamiento con otros fármacos que se dirigen al VEGF, p. ej., otros anticuerpos dirigidos contra VEGF. Además, dada la función propuesta de las células CD11b+/Gr1+ en progreso tumoral, la capacidad de r84/PGN311 para reducir la infiltración o reclutamiento de estas células en tumores puede formar parte del mecanismo implicado en la actividad antitumoral, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral mostrada por r84/PGN311.

También se ha mostrado que la administración crónica de r84/PGN311 no induce toxicidad en ratones.

Estas son indicaciones positivas adicionales del potencial terapéutico del anticuerpo r84.

B2. Anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2

Una parte importante de esta invención, confirmada usando ELISA, ensayos de unión a receptor y ensayos de activación de receptor, es que los anticuerpos de la invención bloquean selectivamente la interacción del VEGF con VEGFR2 (KDR/Flk-1), pero no con VEGFR1 (FLT-1). Los anticuerpos inhiben la fosforilación inducida por el VEGF del VEGFR2 e inhiben la señalización por el VEGFR2. Los anticuerpos también tienen una potente actividad antitumoral, que detiene el crecimiento de tumores sólidos humanos establecidos en modelos de cáncer humano en animales aceptados en la técnica. Además, los anticuerpos humanos de la invención tienen propiedades

antiangiogénicas y reducen la densidad de microvasos en los tumores.

Estas propiedades demuestran la utilidad de los anticuerpos en la disección de las rutas que son activadas por el VEGF en células que expresan tanto VEGFR1 como VEGFR2, así como en resaltar la importancia de la actividad del VEGFR2 en el proceso del crecimiento o supervivencia tumoral. Lo que es más importante, proporcionan un modo único de intervención terapéutica para un anticuerpo humano, que permite la inhibición específica de la angiogénesis inducida por VEGFR2, sin inhibición simultánea de sucesos mediados por VEGFR1, tales como la función de osteoclastos y condrocitos.

10 Los anticuerpos de la presente invención, llamados de manera sucinta "anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2", representan un avance en el campo y proporcionan numerosas ventajas, tanto en términos de usos en forma no conjugada o "desnuda" como cuando están conjugados o asociados con otros agentes terapéuticos.

15 Los estudios de unión in vitro de la presente invención demuestran que los anticuerpos humanos bloquean la unión del VEGF a VEGFR2, pero no inhiben la unión del VEGF a VEGFR1.

Los anticuerpos humanos de la presente invención son, por lo tanto, significativamente mejores frente a otros anticuerpos bloqueantes contra el VEGF, incluyendo el anticuerpo A4.6.1 murino y su homólogo humanizado, Avastin (bevacizumab). Los anticuerpos dirigidos contra VEGF A4.6.1 y Avastin bloquean la unión del VEGF a ambos receptores del VEGF. Estudios cristalográficos y de mutagénesis han mostrado que los epítopos de unión para VEGFR2 y VEGFR1 se concentran hacia los dos polos simétricos del dímero de VEGF (Wiesmann y col, 1997; Muller y col, 1997). Los determinantes de unión en el VEGF que interaccionan con los dos receptores se superponen parcialmente y se distribuyen sobre cuatro segmentos diferentes que se extienden a lo largo de la superficie del dímero (Muller y col, 1998). El anticuerpo 4.6.1 se une a una región del VEGF dentro de la región de unión al receptor de ambos receptores (Muller y col, 1998).

Los estudios del efecto de los anticuerpos humanos de la invención en la fosforilación inducida por el VEGF de los receptores mostraron que los anticuerpos bloquean la fosforilación inducida por el VEGF del VEGFR2. Los estudios también han mostrado que los anticuerpos humanos de la invención inhiben la señalización celular vía VEGFR2, por ejemplo, se ha mostrado que los anticuerpos inhiben la fosforilación de Erk1/2 y PLC- γ en ensayos in vitro.

Los anticuerpos humanos de la invención inhiben el crecimiento de tipos de tumores humanos in vivo. La magnitud de supresión de crecimiento tumoral por los anticuerpos humanos de la invención es similar a la obtenida usando diferentes anticuerpos neutralizantes dirigidos contra VEGF, incluyendo Avastin. La eficacia de estos anticuerpos humanos, que son similares a lo que otros investigadores han encontrado usando diferentes anticuerpos dirigidos contra VEGF, demuestra además la función del VEGF en la angiogénesis tumoral y crecimiento tumoral. Sin embargo, los anticuerpos humanos de la invención deberían proporcionar un producto terapéutico más seguro, basándose en las propiedades inhibitorias específicas descritas en el presente documento y en vista de que son anticuerpos complemente humanos.

El hecho que se pueden lograr remisiones, en lugar de estasis tumoral, sugiere que el VEGF está proporcionando más que solo una señal angiogénica para el endotelio tumoral. Benjamin y col. (1999) han descrito recientemente que los tumores contienen una gran fracción de vasos sanguíneos inmaduros que todavía tienen que establecer contacto con células periendotheliales y que estos vasos sanguíneos dependen del VEGF para la supervivencia. Es posible que la neutralización del VEGF provoque que estos vasos sanguíneos inmaduros sufran apoptosis, reduciendo de este modo la red vascular existente en el tumor. También es posible que se produzca un proceso dinámico de remodelado vascular en los tumores, que implica tanto la formación de vasos como la remisión de vasos, y que la neutralización del VEGF impida la formación de vasos que conduzca a un cambio neto hacia la remisión de los vasos.

El descubrimiento de que los anticuerpos humanos de la invención suprimen el crecimiento tumoral de forma tan completa como Avastin (sino más) indica una función dominante para el VEGFR2 en la angiogénesis tumoral. El proceso de múltiples etapas de la angiogénesis requiere quimiotaxis, producción de metaloproteinasas, invasión, proliferación y diferenciación de células endoteliales. El VEGFR1 puede no tener función en estos procesos, o puede ayudar en el proceso uniéndose al VEGF y presentándolo al receptor de señalización, VEGFR2.

Las cifras comparables para los anticuerpos humanos de la invención y Avastin en el tratamiento tumoral son muy relevantes: los anticuerpos humanos de la invención son al menos tan eficaces como Avastin, aunque solo inhiben la

unión del VEGF a VEGFR2 y no a VEGFR1. Por lo tanto los presentes estudios indican que el VEGFR1 no tiene una función notable en la angiogénesis tumoral mediada por el VEGF y sugiere además que los inhibidores específicos de VEGFR1 pueden no influir en la angiogénesis tumoral. Estos resultados también significan que los anticuerpos humanos de la invención pueden ser igualmente o más eficaces que Avastin, pero produciendo menos efectos secundarios.

La capacidad para bloquear específicamente la unión del VEGF hacia y la activación de VEGFR2, pero no VEGFR1 (Flt-1), tiene importancia clínica. Los anticuerpos humanos de la presente invención bloquean por lo tanto la actividad angiogénica del VEGF, pero no inhiben otras acciones beneficiosas de VEGF, mediadas a través de VEGFR1, tales como aquellas en ciertas células inmunitarias y óseas. Un área de importancia clínica se refiere por lo tanto a la capacidad de los anticuerpos humanos de esta invención para funcionar *in vivo* sin inhibir los efectos beneficiosos de osteoclastos y condrocitos. Esto significa que el uso de los presentes productos terapéuticos de anticuerpo humanos dirigido contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, no se asociará con los efectos secundarios en el hueso y/o cartílago.

Los estudios *in vivo* han mostrado que el VEGF acopla el remodelado, osificación y angiogénesis hipertrófica del cartílago durante la formación ósea endocondral y que el VEGF es esencial para el remodelado del cartílago (Gerber y col., 1999). Se mostró que la inactivación de la señalización del VEGF a través del VEGFR1, por administración de la proteína quimérica soluble del receptor VEGFR1 (Flt-(1-3)-IgG), deteriora la formación de hueso trabecular y la expansión de la zona hipertrófica de condrocitos disminuyendo el reclutamiento y/o diferenciación de los condrocitos (Gerber y col., 1999).

Se ha mostrado además que el VEGF puede sustituir al factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF) en el soporte de la función de osteoclastos *in vivo* (Niida y col., 1999).

En estudios que usan ratones osteopetróticos (op/op) con una deficiencia en osteoclastos que resulta de una mutación en el gen de M-CSF, la inyección de M-CSF recombinante humano (rhM-CSF) permite el reclutamiento y supervivencia de los osteoclastos. En estudios recientes, se ha mostrado que una inyección única de VEGF recombinante humano puede inducir de manera similar el reclutamiento de osteoclastos en ratones op/op (Niida y col., 1999).

Niida y col. (1999) describieron que puesto que los osteoclastos expresan predominantemente VEGFR1, y que la actividad del factor 1 de crecimiento placentario humano recombinante en el reclutamiento de osteoclastos era comparable a la del rhVEGF, los efectos beneficiosos de la señalización del VEGF en ratones osteopetróticos (op/op) eran mediados por el receptor 1 de VEGF (VEGFR-1). Estos autores mostraron además que los osteoclastos inducidos por rhM-CSF murieron después de inhibir el VEGF (usando una proteína quimérica del receptor VEGFR1, VEGFR1/Fc), pero que dichos efectos se anularon por inyecciones concomitantes de rhM-CSF. Los osteoclastos soportados por rhM-CSF o VEGF endógeno no mostraron diferencia significativa en la actividad *in vivo* (Niida y col., 1999).

Los ratones op/op mutantes sufren una resolución relacionada con la edad de osteopetrosis acompañada de un aumento en el número de osteoclastos. En los estudios de Niida y col. (1999), la mayoría de los osteoclastos desaparecieron después de inyecciones del anticuerpo dirigido contra VEGF, demostrando que el VEGF producido de manera endógena es responsable de la aparición de los osteoclastos en los ratones mutantes. Además, el rhVEGF reemplazó al rhM-CSF en el soporte de la diferenciación *in vitro* de osteoclastos. Estos resultados demuestran que M-CSF y VEGF tienen funciones que se solapan en el soporte de la función de osteoclastos y que VEGF actúa a través del receptor del VEGFR-1 (Niida y col., 1999).

Por lo tanto, se puede concluir que los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención no bloquean al VEGF en la unión y activación de VEGFR1, pero bloquean al VEGF en la unión y activación al VEGFR2. Los efectos antitumorales de dicha inhibición de VEGFR2 redondos se demuestran claramente. Estos resultados muestran que el VEGFR2 es el receptor del VEGF que media la permeabilidad y resalta su papel en la angiogénesis tumoral.

Por lo tanto esta invención valida además la inhibición del VEGF como terapia para el tratamiento de tumores sólidos. Lo que es más importante, la invención proporciona una variedad de nuevos anticuerpos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 para intervención terapéutica, y en particular, para usar como fármacos seguros y eficaces para inhibir la angiogénesis en tumores y otras enfermedades.

Los beneficios de la presente invención no se limitan a la carencia de efectos secundarios. Aunque estas son características importantes que tendrán beneficios notables, en particular en el tratamiento de niños y pacientes con trastornos óseos, los anticuerpos de la invención tienen numerosas ventajas diferentes.

5 Por ejemplo, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención tienen ventajas importantes en la inhibición de las acciones perjudiciales de macrófagos asociados a tumor. Ahora se sabe que los macrófagos asociados a tumor tienen funciones importantes en el cáncer, tanto en las etapas iniciales de desarrollo como en el progreso y metástasis tumoral. Como se detalla más adelante, los anticuerpos humanos de esta invención son idealmente adecuados para contrarrestar los efectos adversos de estos macrófagos.

10 La formación de una vasculatura tumoral y/o el acceso a la vasculatura del hospedante es una etapa crucial en el desarrollo de tumores malignos. De hecho, la formación de una red de vasos de alta densidad, llamada "el interruptor angiogénico", está estrechamente asociada con la transición a la malignidad (Hanahan y Folkman, 1996). Ahora se sabe que los macrófagos asociados con el tumor primario tienen una función clave tanto en el interruptor angiogénico como en el progreso a la malignidad (Lin y col., 2006). Además, se ha mostrado que la inhibición de la infiltración de macrófagos en tumores retrasa e interruptor angiogénico y la transición a la malignidad (Lin y col., 2006).

20 En muchos pacientes con cáncer, la metástasis es la causa final de muerte. La invasión de células tumorales desde el tumor primario al tejido conjuntivo circundante y vasos sanguíneos es una etapa clave en el proceso metastático. Se describió anteriormente que los macrófagos están asociados con progresos y metástasis tumoral (Lin y col., 2001). Los estudios subsiguientes han mostrado que la interacción entre las células tumorales y los macrófagos facilitan la migración de células de carcinoma en el tumor primario, y que este proceso comprende un bucle paracrina (Wyckoff y col., 2004; Goswami y col, 2005).

25 Además, ahora se sabe que los macrófagos infiltrantes de tumor o asociados a tumor son prominentes en varios microentornos tumorales, incluyendo áreas de invasión, áreas estromales y perivasculares y áreas avasculares y perinecróticas. Las acciones de los macrófagos en cada uno de estos microentornos tumorales estimula el progreso y metástasis tumoral al promover la motilidad, metástasis y angiogénesis de células de cáncer, respectivamente (Lewis y Pollard, 2006). Por lo tanto, recientemente los macrófagos se han convertido en un objetivo importante en la batalla contra el cáncer (Condeelis y Pollard, 2006).

35 En relación con esto, los anticuerpos humanos de la presente invención tienen ventajas importantes puesto que bloquean la activación del VEGFR2 y por lo tanto reducen la infiltración de macrófagos en los tumores, y por lo tanto pueden reducir la transición a la malignidad, progreso y/o metástasis tumoral. Esto está validado por los resultados de estudios en animales presentados en el presente documento que muestran que los macrófagos asociados a tumor expresan VEGFR2, y que el VEGFR2 media la quimiotaxis inducida por el VEGF de estas células. También se muestra en el presente documento que el bloqueo selectivo del VEGFR2 provocado por los anticuerpos humanos de esta invención ejerce un potente efecto antineoplásico. Este efecto antineoplásico va acompañado por una reducción en la infiltración de macrófagos en el tumor, indicando que el bloqueo selectivo de la interacción de VEGF-VEGFR2 en los macrófagos del hospedante contribuye a los efectos terapéuticos observados.

40 Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de esta invención también tienen ventajas con respecto a reducir la densidad de vasos linfáticos en los tumores. Además de salir de las células tumorales a los vasos sanguíneos tumorales, la metástasis se facilita por la linfangiogénesis, es decir, el crecimiento de nuevos vasos linfáticos intratumorales o peritumorales a partir de los vasos preexistentes. De hecho, en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, el escape de células tumorales por el sistema linfático se cree que es el medio predominante por el cual las células malignas del tumor primario se siembran en sitios distantes.

50 Durante varios años, se pensó que la linfangiogénesis era inducida principalmente por VEGF-C y/o VEGF-D. Sin embargo ahora se ha acumulado un conjunto de pruebas que implican al VEGF-A en la linfangiogénesis. Además, estudios recientes han mostrado que anticuerpos murinos contra el VEGF-A son eficaces en la inhibición de la linfangiogénesis y metástasis tumoral in vivo (Whitehurst y col., 2007).

55 Los resultados se presentan en el presente documento para mostrar que los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de esta invención de hecho reducen la densidad de vasos linfáticos tumorales (figura 18A, figura 18B y figura 18C). Por lo tanto, los anticuerpos humanos de la presente invención inhibirán la linfangiogénesis tumoral y proporcionarán el beneficio adicional de reducir la metástasis por la ruta linfática, así como de inhibir la angiogénesis y escape metastático por vasos sanguíneos tumorales. Por lo tanto, se puede ver

que los anticuerpos humanos de la presente invención tienen la capacidad de reducir la metástasis o sucesos metastáticos por varios puntos de intervención.

Además, los datos en la figura 18A muestran que los anticuerpos de la presente invención reducen la densidad de los vasos linfáticos tumorales medido por una reducción en la podoplanina y en PROX1. Puesto que la podoplanina es un marcador para cánceres de tejido blando, tal como condrosarcoma, y para tumores linfáticos, tal como sarcoma de células dendríticas foliculares) (Xie y col., 2008), y puesto que se ha implicado PROX1 en la predicción de la invasión de cáncer de colon (Petrova y col., 2008), esto enfatiza el uso de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención para tratar estas indicaciones particulares de enfermedad.

Una propiedad adicional ventajosa mostrada por los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de esta invención es la capacidad para reducir significativamente la infiltración o reclutamiento de células supresoras derivadas de mieloides, en particular células CD11b+/Gr1+, en tumores. Además, el anticuerpo 2C3 no muestra esta propiedad y Avastin sólo a un nivel muy reducido. Los anticuerpos preferidos de la invención pueden disminuir la infiltración o reclutamiento de células CD11b+/Gr1+ en tumores (p. ej., disminución del número de células doble positivas presentes en los tumores) en 30 % o más, preferiblemente en 32 %, 34 %, 36 %, 38 % o más, comparado con un nivel de control (p. ej., un tumor no tratado o un tumor tratado con un anticuerpo de control).

Por lo tanto, estudios adicionales en ratones que llevan el tumor MDA-MB-231 han mostrado que significativamente menos células doble positivas CD11b+/Gr1 se infiltran en tumores en animales tratados con r84 en oposición al control. En estudios comparativos, ni el anticuerpo 2C3 ni Avastin mostraron una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+, aunque se midió alguna reducción en animales tratados con Avastin. La reducción en el número de células doble positivas observada es de 39 % (figura 25).

La infiltración reducida de células supresoras derivadas de mieloides CD11b+/Gr1+ es de interés especial, puesto que las células que expresan ambos marcadores se han asociado recientemente con la mediación de la capacidad de refracción tumoral a terapia con anticuerpo dirigido contra VEGF (Shojaei y col., 2007). Las células supresoras derivadas de mieloides (CD11b+/Gr1+) también son un contribuyente importante al progreso tumoral. En el microentorno tumoral, estas células segregan mediadores inmunosupresores e inducen disfunción de linfocitos T (Gabrilovich y col., 2001; Serafini y col., 2004).

Puesto que las células CD11b+/Gr1+ están asociadas con capacidad de refracción tumoral a terapia con anticuerpo dirigido contra VEGF y contribuyen al progreso tumoral, el efecto de los anticuerpos de la invención para reducir la infiltración de estas células en tumores tiene claramente una importante potencial para aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos de la invención, en particular aplicaciones terapéuticas relacionadas con el tratamiento de enfermedades angiogénicas, incluyendo cáncer.

De hecho, puesto que los resultados del presente documento muestran que la infiltración tumoral de células CD11b+/Gr1+ es menos pronunciada/significativamente menor en los animales tratados con anticuerpos de la invención, sugiere que el tratamiento con anticuerpos de la invención es probable que sea menos propenso al desarrollo de resistencia a fármacos o capacidad de refracción a terapia con anticuerpo dirigido contra VEGF que el tratamiento con otros fármacos dirigidos al VEGF, por ejemplo, otros anticuerpos dirigidos contra VEGF. Además, dada la función propuesta de las células CD11b+/Gr1+ en el progreso tumoral, la capacidad de los anticuerpos de la invención para reducir la infiltración o reclutamiento de dichas células en tumores puede formar parte del mecanismo implicado en la actividad antitumoral, p. ej., la inhibición del crecimiento tumoral mostrado por los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de esta invención también han mostrado que inducen toxicidad cuando se administran de manera crónica en modelos in vivo de ratón.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de esta invención tienen preferiblemente la propiedad ventajosa de unirse al VEGF de ratón y al VEGF humano. La capacidad para unirse al VEGF de ratón es una ventaja importante con respecto a los anticuerpos 2C3 y Avastin.

Además, los conjugados de anticuerpo basados en los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención, se pueden usar para suministrar agentes terapéuticos al entorno tumoral, mientras que muchos otros anticuerpos dirigidos contra VEGF no lo hacen. Los anticuerpos humanos de la invención se unen tanto a vasculatura tumoral como a estroma tumoral tras la administración in vivo, pero no se unen a vasculatura o tejido conjuntivo en órganos o tejidos normales. Por lo tanto las construcciones terapéuticas

basadas en los presentes anticuerpos humanos tienen la ventaja de combinar dos funciones dentro de una molécula: las propiedades antiangiogénicas del anticuerpo o fragmento del mismo y las propiedades del agente terapéutico seleccionado para la unión. En resumen, un anticuerpo humano de la presente invención se puede usar tanto como un agente antiangiogénico y como un agente de direccionamiento vascular, mientras que muchos anticuerpos dirigidos contra VEGF de la técnica anterior no se pueden usar en el direccionamiento vascular.

Puesto que el VEGFR2 es el receptor clave en el endotelio, el bloqueo de la unión del VEGF al VEGFR2 es crítico para un efecto antiangiogénico. Aunque el VEGFR1 es expresado en el endotelio, no es transductor de señales, o es pasivo, en este contexto. Por lo tanto, la incapacidad de los anticuerpos humanos de la presente invención para bloquear la unión del VEGF al VEGFR1 no tiene consecuencia en su eficacia como agentes antiangiogénicos y antitumorales. De hecho, en lugar de inhibir la unión del VEGF al VEGFR1, lo cual ocurre con los anticuerpos bloqueantes de la técnica anterior, la capacidad de los presentes anticuerpos humanos para unirse al VEGF y no perturbar sustancialmente las interacciones VEGF-VEGFR1 mejora las propiedades de suministro de fármaco de estos nuevos anticuerpos.

Los autores de la presente invención se dieron cuenta que esperarían que los anticuerpos bloqueantes todavía funcionarían para suministrar agentes terapéuticos al entorno tumoral por la unión al VEGF localizado en tumor que no está unido a un receptor. Específicamente, entendieron que dichos anticuerpos humanos se unirán al VEGF en el estroma tumoral y suministrarán agentes terapéuticos al mismo. Esto proporciona un depósito de fármaco alrededor del endotelio, provocando efectos citotóxicos u otros efectos destructivos en las células endoteliales vasculares y ejerciendo un efecto antitumoral.

El VEGF asociado con el estroma o tejido conjuntivo no se une a un receptor del VEGF en el sentido clásico, es decir, un receptor de superficie celular. Más bien, el VEGF se une a uno o más componentes de tejido conjuntivo, incluyendo proteoglicanos, tales como proteoglicano de heparán sulfato, a través de una región básica del VEGF. Estas secuencias (y los exones que las codifican) están ausentes en la proteína VEGF121 (y el ADN subyacente), de modo que esta isoforma no debe estar presente en el estroma en cantidades significativas. El VEGF en el estroma tumoral frecuentemente se llama "libre", aunque esté localizado todavía dentro del tumor, de modo que "libre" significa esencialmente no unido a receptor.

Los autores de la invención dedujeron además que un anticuerpo humano que bloquea la unión del VEGF a uno, pero no a ambos receptores, todavía sería capaz de suministrar agentes terapéuticos al entorno tumoral por la unión al VEGF unido a receptor en la vasculatura. Ésta es una de las características ventajosas de la presente invención. En concreto, proporcionar anticuerpos humanos que bloquean la unión del VEGF al VEGFR2, y por lo tanto inhiben la señal angiogénica del VEGF, pero que no bloquean la unión del VEGF al VEGFR1. Además de reducir los efectos secundarios sistémicos al mantener la señalización del VEGF mediante el VEGFR1 en otros tipos de células y tejidos, estos anticuerpos humanos son capaces de localizar el complejo VEGF-VEGFR1 en la vasculatura tumoral y suministrar agentes terapéuticos directamente al mismo.

Tanto el VEGFR1 como VEGFR2 son regulados por aumento en células endoteliales tumorales, en contraposición a células endoteliales en tejidos normales. El VEGFR1 es altamente expresado en el endotelio vasculatura tumoral, lo que hace que los aspectos de direccionamiento de la presente invención sean en particular eficaces. De hecho, el VEGFR1, aunque "sin señalizador" en el endotelio, es expresado al menos a los mismos niveles que el VEGFR2, si no a niveles mayores. Un factor que subyace este fenómeno es que el VEGFR1 es regulado por aumento en respuesta tanto a hipoxia como al VEGF, mientras que el VEGFR2 solo es regulado por aumento en respuesta a VEGF y no está influido por la hipoxia.

Aunque el papel del VEGFR1 en el endotelio permanece incierto, el VEGFR1 puede actuar como un receptor señuelo para "capturar" VEGF y pasar el ligando sobre el receptor de señalización, VEGFR2. Para que esto sea cierto, se esperaría que el receptor señuelo tuviera una mayor afinidad por el VEGF que por el receptor de señalización, que es en realidad el caso. En vista de esto, y quizá también debido a los niveles de expresión potenciados, los anticuerpos humanos bloqueantes de VEGFR2 y no bloqueantes de VEGFR1 de esta invención son agentes de suministro ideales para el tratamiento de tumores. Los conjugados terapéuticos de estos anticuerpos son capaces de inhibir de manera simultánea la angiogénesis a través de VEGFR2 y destruir la vasculatura existente al suministrar un agente terapéutico al complejo de VEGF-receptor VEGFR1.

Los autores de la invención no se limitan de ninguna manera al razonamiento científico anterior como una explicación para las propiedades beneficiosas antiangiogénicas y localizadoras de tumor de los presentes anticuerpos humanos. Aunque la utilidad de la invención es evidente por sí misma y no necesita teoría subyacente

para ponerla en práctica, los autores de la invención han considerado mecanismos alternativos por los cuales los anticuerpos humanos bloqueantes de VEGFR2 y no bloqueantes de VEGFR1 pueden localizar eficaz y específicamente la vasculatura tumoral.

- 5 Dichos anticuerpos humanos pueden unirse al VEGF que está asociado con otra proteína conocida, o todavía no caracterizada de unión al VEGF en la superficie celular o pueden unirse al VEGF que está unido a proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie de células endoteliales. La localización del anticuerpo también se puede mejorar por la unión a otro miembro de la familia de proteínas de VEGF, es decir, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, que están asociados con los vasos sanguíneos, aunque esto es menos probable.

10

Otra propiedad ventajosa de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención es que estos anticuerpos neutralizan la señal de supervivencia o “efecto protector” del VEGF, que es mediada por el VEGFR2. Además de hacer a los propios anticuerpos humanos más eficaces, esta propiedad los hace en particular útiles en combinación con otros agentes que están impedidos por la función de supervivencia de

15 VEGF.

Por ejemplo, el VEGF protege al endotelio de la radioterapia. Por lo tanto, tanto los anticuerpos desnudos como los inmunoconjugados de la presente invención son ideales para usar en combinación con radioterapia. Se proporcionan incluso más beneficios mediante el uso de dicho anticuerpo humano unido a un agente radioterapéutico. Este tipo de construcción tendría la triple ventaja de: (1) ejercer un efecto antiangiogénico a través de la parte de anticuerpo; (2) ejercer un efecto destructivo de la vasculatura tumoral a través de la distribución del agente radioterapéutico; y (3) prevenir que la señal de supervivencia típica del VEGF contrarreste los efectos del agente radioterapéutico.

20

- 25 Otras construcciones con efectos sinérgicos similares son anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 en asociación con fármacos o profármacos antitubulina, agentes antiapoptóticos y otros agentes antiangiogénicos. Las acciones de los agentes o fármacos que producen apoptosis son antagonizadas por el VEGF. Por lo tanto, la presente invención mejora la eficacia de dichos agentes al neutralizar el VEGF. Las señales de supervivencia del VEGF también se oponen a la endostatina, que limita esta terapia. Por lo tanto, en uso combinado con endostatina, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención neutralizarán el VEGF y amplificarán los efectos antitumorales de la endostatina. Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 también se pueden usar para suministrar de manera específica colagenasa al tumor, donde la colagenasa producirá endostatina en el sitio, logrando beneficios similares.

30

- 35 En todas estas combinaciones sinérgicas o potenciadas, los anticuerpos humanos y otros agentes se pueden administrar por separado, o los segundos agentes se pueden unir a los anticuerpos humanos para el suministro específica (es decir, suministro dirigido al VEGFR1). En combinaciones con endostatina, se preferirán conjugados químicos o proteínas de fusión recombinantes, puesto que estos contrarrestarán la vida media corta de la endostatina, lo que actualmente es una limitación de la terapia potencial de la endostatina. También se pueden emplear combinaciones con, o formas dirigidas de activador de plasminógeno tisular (tPA).

40

Las ventajas adicionales de los productos terapéuticos humanos de la presente invención incluyen la capacidad para disminuir la presión intersticial. Puesto que la mayor permeabilidad mediada por el VEGF, contribuye a la presión intersticial, la señalización reducida por el VEGFR2 reducirá tanto la permeabilidad como la presión intersticial. Esto a su vez reducirá la barrera a fármacos que atraviesan la totalidad del tejido tumoral, de modo que se puedan matar las células tumorales distantes de la vasculatura. También se puede lograr terapia prolongada puesto que las presentes composiciones no tienen o tienen una inmunogenicidad insignificante o baja.

45

B3. Secuencias de CDR de anticuerpo

50

El término “variable”, como se usa en el presente documento en referencia a los anticuerpos, significa que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos, y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de manera uniforme a lo largo de todos los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados “regiones hipervariables”, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada.

55

Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman la región armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno, cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4,

respectivamente), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan, y en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β .

Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (Kabat y col., 1991). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diferentes funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

- 10 La expresión “región hipervariable”, como se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y restos 31-35 (H1), 50-56 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat y col., 1991), y/o los restos de un “bucle hipervariable” (es decir, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada). Los restos “armazón” o “FR” son los restos de dominio variable diferentes de los restos de región hipervariable como se define en el presente documento.

- 20 Las secuencias de ADN y de aminoácidos deducida de las cadenas VH y VL del fragmento ScFv de r84 se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (VH, ácido nucleico), SEQ ID NO: 2 (VL, ácido nucleico) SEQ ID NO: 3 (VH, aminoácidos) y SEQ ID NO: 4 (VL, aminoácidos). Las secuencias de ADN de las cadenas VH y VL de la IgG de longitud completa de r84 se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 26 (VH, ácido nucleico) y SEQ ID NO: 27 (VL, ácido nucleico). Estas secuencias abarcan las CDR1-3 de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo.

- 25 Como se describe en el presente documento (Sección C7), proporcionando información estructural y funcional para una molécula biológica, se puede generar una variedad de moléculas equivalentes, o incluso mejoradas. Esto se aplica a los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención, como se ilustra por el anticuerpo r84. Aunque se debe conservar la unión al antígeno y otras propiedades funcionales de un anticuerpo, existe un grado extremadamente alto de conocimiento en la técnica para producir anticuerpos equivalentes e incluso mejorados una vez que se ha proporcionado un anticuerpo de referencia. Dicha habilidad técnica se puede aplicar, en vista de las secuencias y de la información proporcionada en el presente documento, a la producción de anticuerpos adicionales que tienen características iguales, mejoradas o de otro modo deseables.

- 35 Para anticuerpos equivalentes, algunos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en las regiones armazón de dominio constante o variable del anticuerpo sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva. Se prefiere que dichos cambios se hagan en las secuencias de ADN que codifican las partes de anticuerpo y que los cambios sean de naturaleza conservadora (véase la Sección C7, la información de codones en la tabla A, y los detalles técnicos de soporte en la mutagénesis específica del sitio). De manera natural, existe un límite al número de cambios que se deben hacer, pero esto será bien conocido por los expertos en la técnica.

- Otros tipos de variantes son anticuerpos con propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original a partir del cual se generaron. Dichas variantes, o compuestos de segunda generación, son típicamente variantes de sustitución que implican uno o más restos sustituidos de la región hipervariable de un anticuerpo original. Una manera conveniente para generar estas variantes de sustitución es maduración por afinidad usando presentación en fagos.

- En la maduración por afinidad usando presentación en fagos, se mutan varios sitios de región hipervariable (p. ej. 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de una manera monovalente de las partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fago después se criban según su actividad biológica (p. ej. afinidad de unión) como se describe en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede realizar la mutagénesis de barrido con alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno.

Alternativamente, o además, está contemplado que la estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo se defina y analice para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el VEGF. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para sustitución. Una vez que se generan estas variantes, el panel de variantes se somete a

cribado, como se describe en el presente documento, y se seleccionan para desarrollo adicional los anticuerpos con propiedades análogas pero diferentes o incluso superiores en uno o más ensayos relevantes.

Aspectos adicionales de la invención se refieren por lo tanto a segmentos de ADN aislados o purificados y vectores recombinantes que codifican regiones CDR de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, de la invención, tal como las cadenas pesada y ligera de r84, y la creación y uso de células hospedantes recombinantes a través de la aplicación de tecnología de ADN, que expresan dichas regiones CDR.

- 10 La presente invención se refiere por lo tanto a segmentos de ADN humanos o sintéticos, que están libres de ADN genómico total y son capaces de expresar regiones CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, de la invención, tales como las cadenas pesada y/o ligera de r84. Como se usa en el presente documento, el término "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que se ha aislado o purificado exenta de ADN genómico total de una especie particular. Están incluidos dentro de la expresión
- 15 "segmento de ADN", los segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares.

- De manera similar, un segmento de ADN que comprende un segmento codificante o porción de gen aislada o purificada que codifica las regiones CDR purificadas de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención, tal como las cadenas pesada y/o ligera de r84, se refiere a un segmento de ADN que incluye dichas secuencias codificantes, y en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas o purificadas sustancialmente de otros genes o secuencia que codifican proteínas que se presentan de forma natural. En relación con esto, el término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una unidad codificadora funcional de proteína, polipéptido o péptido. Como entenderán los expertos en la técnica, este término
- 20 funcional incluye las secuencias naturales que codifican el anticuerpo y segmentos más pequeños transformados por ingeniería genérica que expresan, o se pueden adaptar para expresar, péptidos, polipéptidos o proteínas de unión al antígeno.

- "Aislado o purificado sustancialmente de otras secuencias codificantes" significa que el segmento codificante o porción génica aislada de interés forma la parte significativa de la región codificante del segmento de ADN, y que el segmento de ADN no contiene grandes porciones de ADN codificante que se presente de manera natural, tal como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de cADN. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN como se aísla originalmente, y no excluye genes o regiones codificantes añadidas posteriormente al segmento por el hombre.

- 35 En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos codificantes aislados o purificados o porciones génicas aisladas o purificadas y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican regiones CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, de la invención, tales como cadenas pesada y/o ligera de r84, que comprenden al menos una primera región de secuencia
- 40 que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 90 % y lo más preferiblemente, al menos aproximadamente 95 % o aproximadamente de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; en donde dichas regiones CDR mantienen al menos sustancialmente las propiedades biológicas de las regiones CDR
- 45 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

- Como se describe en el presente documento, las secuencias pueden comprender ciertos aminoácidos equivalentes biológicamente funcionales o "sustituciones conservadoras". Otras secuencias pueden comprender aminoácidos funcionalmente no equivalentes o "sustituciones no conservadoras" deliberadamente transformadas por ingeniería
- 50 genética para mejorar las propiedades de la CDR o anticuerpo que contiene la CDR, como conocen los expertos en la materia y se describe además en el presente documento.

- También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico pueden incluir restos adicionales, tal como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias 5' o 3', y corresponder todavía a una secuencia de la invención, siempre que la secuencia cumpla los criterios expuestos anteriormente, que incluyen preferiblemente el mantenimiento o mejora de la actividad de la proteína biológica cuando se refiere a expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales incluye varias secuencias no codificantes que flanquean las partes 5' o 3' de la región codificante, y también regiones de control.

Los segmentos de ácido nucleico de la presente invención se pueden combinar por lo tanto con otras secuencias de ADN, tal como promotores, señales de poliadenilación, sitios adicionales de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, tal que su longitud total pueda variar considerablemente. Por lo tanto, está contemplado que se puede usar un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total limitada preferiblemente por la facilidad de preparación y por el uso en el protocolo previsto de ADN recombinante.

Por lo tanto, los vectores recombinantes forman aspectos adicionales de la presente invención. Se contempla que los vectores en particular útiles sean aquellos vectores en los cuales la parte codificante del segmento de ADN esté colocada bajo el control de un promotor. En general, aunque de manera no exclusiva, se usará un promotor recombinante o heterólogo, es decir, un promotor normalmente no asociado con secuencias codificantes en su entorno natural. Dichos promotores pueden incluir promotores bacterianos, víricos, eucariotas y de mamíferos, con la condición de que el promotor dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula, organismo o incluso animal, elegido para la expresión.

El uso de combinaciones de promotor y tipo de célula para la expresión de proteínas es conocida por los expertos en la materia de biología molecular. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, o inducibles, y se pueden usar bajo las condiciones adecuadas para dirigir la expresión de nivel alto del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

La expresión de las secuencias de ácido nucleico de la invención se puede lograr de manera conveniente por una cualquiera o más técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica y descritas adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la última descripción de la expresión recombinante de proteínas de fusión se aplica igualmente bien a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que no están operativamente asociados con otra secuencia codificante al nivel de ácido nucleico.

B4. Anticuerpos de bibliotecas de fagémidos

La tecnología recombinante ahora permite la preparación de anticuerpos que tienen la especificidad deseada de genes recombinantes que codifican una variedad de anticuerpos (Van Dijk y col., 1989). Algunas técnicas recombinantes comprenden el aislamiento de genes de anticuerpo por cribado inmunológico de bibliotecas combinatorias de expresión de fagos de inmunoglobulina, preparadas a partir de ARN aislado del bazo de un animal inmunizado (Morrison y col., 1986; Winter y Milstein, 1991).

Para estos procedimientos, se preparan bibliotecas combinatorias de fagémidos de inmunoglobulina a partir de ARN aislado del bazo del animal inmunizado, y los fagémidos que expresan anticuerpos adecuados se seleccionan por selección por pasos usando células que expresan el antígeno y células control. Las ventajas de este procedimiento con respecto a las técnicas convencionales de hibridoma son que se pueden producir aproximadamente 10^4 veces más anticuerpos y cribar en un solo ciclo, y que se generan nuevas especificidades por la combinación de cadena H y L, que aumenta adicionalmente el porcentaje de anticuerpos adecuados, generados.

Un procedimiento para la generación de un gran repertorio de diversas moléculas de anticuerpo en bacterias usa el bacteriófago lambda como el vector (Huse y col., 1989). La producción de anticuerpos usando el vector lambda comprende la clonación de poblaciones de cadena pesada y ligera de secuencias de ADN en vectores de inicio separados. Los vectores posteriormente se combinan de manera aleatoria para formar un vector único que dirige la coexpresión de cadenas pesada y ligera para formar fragmentos de anticuerpo. Las secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera se obtienen por amplificación, preferiblemente por PCRTM o una técnica de amplificación relacionada, del mRNA aislado de las células del bazo (o hibridomas de las mismas) de un animal que se ha inmunizado con un antígeno seleccionado. Las secuencias de cadena pesada y ligera se amplifican típicamente usando cebadores que incorporan sitios de restricción en los extremos del segmento de ADN amplificado para facilitar la clonación de los segmentos de cadena pesada y ligera en los vectores de inicio.

Otro procedimiento para la generación y cribado de bibliotecas grandes de sitios que combinan anticuerpos completa o parcialmente sintéticos, o paratopos, usa vectores de presentación derivados del fago filamentoso tal como M13, fl o fd. Estos vectores de presentación de fagos filamentosos, denominados "fagémidos", producen grandes bibliotecas de anticuerpos monoclonales que tienen inmunoespecificidades diversas y novedosas. La tecnología usa un dominio de anclaje a la membrana de proteína de cubierta de fago filamentoso como un medio para unir el producto génico y el gen durante la etapa de ensamblaje de la replicación del fago filamentoso, y se ha usado para la clonación y expresión de anticuerpos de bibliotecas combinatorias (Kang y col., 1991; Barbas y col.,

1991).

Esta técnica general para la presentación de fagos filamentosos se describe en la patente de EE.UU. n° 5.658.727. En un sentido más general, el procedimiento proporciona un sistema para la clonación y cribado simultáneos de especificidades de unión a ligando preseleccionadas de los repertorios de genes de anticuerpo usando un sistema de vector único. El cribado de los miembros aislados de la biblioteca según la capacidad de unión a ligando preseleccionada, permite la correlación de la capacidad de unión de una molécula expresada de anticuerpo con un medio conveniente para aislar el gen que codifica el miembro de la biblioteca.

- 10 Se logra la conexión de la expresión y el cribado por la combinación de direccionamiento de un polipéptido de fusión en el periplasma de una célula bacteriana para permitir el ensamblaje de un anticuerpo funcional, y el direccionamiento de un polipéptido de fusión sobre la cubierta de una partícula de fago filamentosos durante el ensamblaje del fago para permitir el cribado conveniente del miembro de interés de la biblioteca. El direccionamiento periplásmico se proporciona por la presencia de un dominio de señal de secreción en un polipéptido de fusión.
- 15 direccionamiento a una partícula de fago se proporciona por la presencia de un dominio de anclaje a membrana de proteína de cubierta de fago filamentosos (es decir, un dominio de anclaje a membrana derivado de cpIII o cpVIII) en un polipéptido de fusión.

- La diversidad de una biblioteca combinatoria de anticuerpos, basada en fagos filamentosos, se puede aumentar por barajado de los genes de cadena pesada y ligera, alterando una o más de las regiones determinantes de complementariedad de los genes clonados de cadena pesada de la biblioteca, o introduciendo mutaciones aleatorias en la biblioteca por reacciones en cadena de la polimerasa propensas a error. Se describen procedimientos adicionales para el cribado de bibliotecas de fagémidos en las patentes de EE.UU. n° 5.580.717; 5.427.908; 5.403.484; y 5.223.409.

- 25 Se ha desarrollado otro procedimiento para el cribado de grandes bibliotecas combinatorias de anticuerpo, usando la expresión de poblaciones de diversas secuencias de cadena pesada y ligera en la superficie de un bacteriófago filamentosos, tal como M13, fl o fd (patente de EE.UU. n° 5.698.426). Se sintetizan dos poblaciones de secuencias diversas de cadena pesada (Hc) y ligera (Lc) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCRTM). Estas poblaciones se clonan en un vector basado en M13 separado que contiene elementos necesarios para la expresión. El vector de la cadena pesada contiene una secuencia de proteína de cubierta del gen VIII (gVIII) de modo que la traducción de las secuencias de cadena pesada produce las proteínas de fusión de gVIII-Hc. Las poblaciones de dos vectores se combinan al azar de modo que sólo las porciones de vector que contienen las secuencias Hc y Lc se unen en un vector circular único.

- 35 El vector combinado dirige la coexpresión tanto de secuencia Hc como Lc para el ensamblaje de los dos polipéptidos y la expresión superficial en M13 (patente de EE.UU. n° 5.698.426). La etapa de combinación junta al azar diferentes secuencias que codifican Hc y Lc dentro de dos poblaciones diversas en un vector individual. Las secuencias de vector donadas de cada vector independiente son necesarias para la producción del fago viable. Además, puesto que las secuencias de pseudo gVIII están contenidas sólo en uno de los dos vectores de inicio, no se puede lograr la coexpresión de los fragmentos funcionales de anticuerpo como proteínas de fusión de gVIII-Hc asociadas a Lc en la superficie del fago hasta que las secuencias de vector se enlacen en el vector individual.

- La expresión de superficie de la biblioteca de anticuerpo se realiza en una cepa supresora ámbar. Un codón de parada ámbar entre la secuencia de Hc y la secuencia de gVIII desenlaza los dos componentes en una cepa no supresora. El aislamiento del fago producido de la cepa no supresora y la infección de una cepa supresora unirán las secuencias de Hc a la secuencia de gVIII durante la expresión. El cultivo de la cepa supresora después de la infección permite la coexpresión en la superficie de M13 de todas las especies de anticuerpo dentro de la biblioteca como proteínas de fusión de gVIII (proteínas de fusión de gVIII-Fab). Alternativamente, se puede aislar el ADN de la cepa no supresora y después introducir en una cepa supresora para lograr el mismo efecto.

- La biblioteca de expresión de superficie se criba para fragmentos Fab específicos que se unen a moléculas preseleccionadas por procedimientos estándar de aislamiento por afinidad. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, selección por pasos (Parmley y Smith, 1988), cromatografía de afinidad y procedimientos de transferencia en fase sólida. Se prefiere la selección por pasos, debido a que se pueden cribar altos títulos de fago, fácilmente, de manera rápida y en pequeños volúmenes. Además, este procedimiento puede seleccionar especies de fragmentos Fab menores dentro de la población, que de otro modo habrían sido indetectables, y amplificar a poblaciones sustancialmente homogéneas. Los fragmentos de Fab seleccionados se pueden caracterizar por secuenciación de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos después de la amplificación de la población de fagos.

Otro procedimiento para producir diversas bibliotecas de anticuerpos y cribado de las especificidades de unión convenientes se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.667.988 y 5.759.817. El procedimiento implica la preparación de bibliotecas de moléculas heterodímeras de inmunoglobulina en la forma de bibliotecas de fagémidos usando oligonucleótidos degenerados y reacciones de extensión de cebadores para incorporar las degeneraciones en las regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera, variables de inmunoglobulina, y la presentación de los péptidos mutagenizados en la superficie del fagémido. Posteriormente, la proteína de presentación se criba por la capacidad para unirse a un antígeno preseleccionado.

- 10 El procedimiento para producir una molécula de inmunoglobulina heterodímera comprende en general (1) introducir un gen codificante de región V de cadena pesada o ligera de interés, en el vector de presentación de fagémido; (2) introducir un sitio de unión aleatorizada en el vector de la proteína de presentación de fagémido por extensión de cebador con un oligonucleótido que contiene regiones de homología con una CDR del gen de la región V de anticuerpo y que contiene regiones de degeneración para producir secuencias codificantes aleatorizadas para formar una población grande de vectores de presentación cada uno capaz de expresar diferentes sitios putativos de unión presentados en una proteína de presentación de superficie de fagémido; (3) expresar la proteína de presentación y el sitio de unión en la superficie de una partícula de fago filamentoso; y (4) aislar (cribar) la partícula de fago expresado en superficie usando técnicas de afinidad tal como la selección por pasos de partículas de fago contra un antígeno preseleccionado, aislando de este modo una o más especies de fagémidos que contienen una proteína de presentación que contiene un sitio de unión que se une a un antígeno preseleccionado.

- En la patente de EE.UU. nº 5.702.892, se describe una variación adicional de este procedimiento para producir bibliotecas diversas de anticuerpos y cribado de las especificidades de unión convenientes. En este procedimiento, se usan sólo secuencias de cadena pesada, las secuencias de cadena pesada se aleatorizan en todas las posiciones de nucleótido que codifican la región hipervariable CDR I o CDR III, y la variabilidad genética en las CDR se genera independiente de cualquier proceso biológico.

- En el procedimiento, se crean por ingeniería dos bibliotecas para barajar genéticamente motivos de oligonucleótido dentro de la región armazón de la estructura de gen de cadena pesada. Mediante la mutación aleatoria de CDR I o CDR III, se reconstruyeron las regiones hipervariables del gen de cadena pesada para dar como resultado una colección de secuencias altamente diversas. Las proteínas de cadena pesada codificadas por la colección de secuencias génicas mutadas tenían el potencial de tener todas las características de unión de una inmunoglobulina a la vez que sólo requerían una de las dos cadenas de inmunoglobulina.

- De manera específica, el procedimiento se practica en la ausencia de la proteína de la cadena ligera de inmunoglobulina. Se incubaba una biblioteca de proteínas de cadena pesada, modificadas, que presentan el fago, con un ligando inmovilizado para seleccionar clones que codifican proteínas recombinantes que se unen de manera específica al ligando inmovilizado. El fago unido entonces se disocia del ligando inmovilizado y se amplifica por crecimiento en células hospedantes bacterianas. Las placas víricas individuales, que cada una expresa una proteína recombinante diferente, se expanden, y entonces se valoran los clones individuales para la actividad de unión.

B5. Ratones transgénicos que contienen bibliotecas de anticuerpos humanos

- Ahora está disponible tecnología recombinante para la preparación de anticuerpos. Además de las bibliotecas combinatorias de expresión de fagos de inmunoglobulina, descritas anteriormente, otro procedimiento de clonación molecular es preparar anticuerpos a partir de ratones transgénicos que contienen bibliotecas de anticuerpos humanos. Estas técnicas se describen en la patente de EE.UU. nº 5.545.807.

- En un sentido más general estos procedimientos implican la producción de un animal transgénico que tiene insertado en su línea germinal material genético que codifica al menos parte de una inmunoglobulina de origen humano o que puede reordenarse para codificar un repertorio de inmunoglobulinas. El material genético insertado se puede producir de una fuente humana, o se puede producir de manera sintética. El material puede codificar al menos parte de una inmunoglobulina conocida o se puede modificar para codificar al menos parte de una inmunoglobulina alterada.

- El material génico insertado es expresado en el animal transgénico, dando como resultado la producción de una inmunoglobulina derivada al menos en parte del material genético de inmunoglobulina humana insertado. Se encuentra que el material genético se reordena en el animal transgénico de modo que se puede producir un repertorio de inmunoglobulinas con una parte o partes derivadas de material genético insertado, incluso si el material

genético insertado se incorpora en la línea germinal en la posición errónea o con la geometría errónea.

El material genético insertado puede estar en la forma de ADN clonado en vectores procariotas tal como plásmidos y/o cósmidos. Se insertan fragmentos más grandes de ADN usando vectores artificiales de cromosoma de levadura (Burke y col., 1987), o introduciendo fragmentos de cromosoma (Richer y Lo, 1989). El material genético insertado se puede introducir en el hospedante de una manera conveniente, por ejemplo por inyección u otros procedimientos en huevos fertilizados o células madre embrionarias.

En aspectos preferidos, se usa un animal hospedante que inicialmente no lleva el material genético que codifique regiones constantes de inmunoglobulina, de modo que el animal transgénico resultante usará solo el material genético humano insertado cuando produzca inmunoglobulinas. Esto se puede lograr usando un hospedante mutante que se presenta de manera natural que carece del material genético relevante, o haciendo artificialmente mutantes, p. ej., en líneas celulares, para crear finalmente un hospedante del cual se ha eliminado el material genético relevante.

Cuando el animal hospedante lleva material genético que codifica regiones constantes de inmunoglobulina, el animal transgénico llevará el material genético que se presenta de manera natural y el material genético insertado y producirá inmunoglobulinas derivadas del material genético que se presenta de manera natural, el material genético insertado, y de mezclas de ambos tipos de material genético. En este caso, la inmunoglobulina deseada se puede obtener cribando hibridomas derivados del animal transgénico, p. ej., aprovechando el fenómeno de exclusión alélica de expresión génica de anticuerpos o pérdida diferencial de cromosomas.

Una vez que se ha preparado un animal transgénico adecuado, el animal simplemente se inmuniza con el inmunógeno deseado. Dependiendo de la naturaleza del material insertado, el animal puede producir una inmunoglobulina quimérica, p. ej., de origen de ratón/humano mezclado, donde el material genético de origen extraño codifica solo parte de la inmunoglobulina; o el animal puede producir una inmunoglobulina completamente extraña, p. ej., de origen completamente humano, donde el material genético de origen extraño codifica una inmunoglobulina completa.

Se pueden producir antisueros policlonales a partir del animal transgénico después de la inmunización. Se pueden separar células productoras de inmunoglobulina del animal para producir la inmunoglobulina de interés. Preferiblemente, se producen anticuerpos monoclonales del animal transgénico, p. ej., fusionando células de bazo del animal con células de mieloma y cribando los hibridomas resultantes para seleccionar los que producen el anticuerpo deseado. En el presente documento se describen las técnicas adecuadas para dichos procedimientos.

En un procedimiento alternativo, el material genético se puede incorporar en el animal de una manera tal que el anticuerpo deseado se produzca en fluidos corporales tales como suero o secreciones externas del animal, tales como leche, calostro o saliva. Por ejemplo, al insertar material genético in vitro que codifica al menos parte de una inmunoglobulina humana en un gen de un mamífero que codifica una proteína láctea y después introducir el gen en un huevo fertilizado del mamífero, p. ej., por inyección, el huevo puede desarrollarse en un mamífero hembra adulto que produzca leche que contenga la inmunoglobulina derivada al menos en parte del material genético de inmunoglobulina humana insertado. El anticuerpo deseado después se puede recoger de la leche. Los expertos en la materia conocen técnicas adecuadas para llevar a cabo dichos procedimientos.

Los animales transgénicos anteriores normalmente se usan para producir anticuerpos humanos de un solo isotipo, más específicamente un isotipo que es esencial para la maduración de células B, tal como IgM y posiblemente IgD. Otro procedimiento preferido para producir anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF es usar la tecnología descrita en las patentes de EE.UU. n° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y 5.770.429; en donde se describen animales transgénicos que son capaces de cambiar de un isotipo necesario para el desarrollo de células B a otros isotipos.

En el desarrollo de un linfocito B, la célula produce inicialmente IgM con una especificidad de unión determinada por las regiones VH y VL reordenadas productivamente. Posteriormente, cada célula B y sus células progeñie sintetizan anticuerpos con las mismas regiones V de cadena L y H, pero puede cambiar el isotipo de la cadena H. El uso de regiones constante mu o delta está determinada en gran medida por empalme alternativo, que permite que la IgM e IgD sean coexpresadas en una sola célula. Los otros isotipos de cadena pesada (gamma, alfa y épsilon) son expresados solo de manera natural después incluso de que una reordenación génica elimine los exones C-mu y C-delta. Este proceso de reordenación génica, denominado cambio de isotipo, se produce típicamente por recombinación entre los llamados segmentos de cambio localizados inmediatamente en la dirección 5' de cada gen

de cadena pesada (excepto delta). Los segmentos de cambio individuales tienen entre 2 y 10 kb de longitud y consisten principalmente en secuencias repetidas, cortas.

- Por estas razones, se prefiere que los transgenes incorporen secuencias reguladoras transcripcionales dentro de aproximadamente 1-2 kb en la dirección 5' de cada región de cambio que se va a usar para el cambio de isotipo. Estas secuencias reguladoras transcripcionales preferiblemente incluyen un promotor y un elemento potenciador, y lo más preferiblemente incluyen la región flanqueadora 5' (es decir, en la dirección 5') que está asociada de manera natural (es decir, se presenta en la configuración de línea germinal) con una región de cambio. Aunque una secuencia flanqueadora 5' de una región de cambio se puede unir operativamente a una región de cambio diferente para la construcción del transgén, en algunas realizaciones, se prefiere que cada región de cambio incorporada en la construcción de transgén tenga la región flanqueadora 5' que se presenta inmediatamente en la dirección 5' en la configuración de la línea germinal que se presenta de manera natural. Se conoce la información de secuencia relacionada con secuencias de región de cambio de inmunoglobulina (Mills y col., 1990; Sideras y col., 1989).
- En el procedimiento descrito en las patentes de EE.UU. n° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y 5.770.429, los transgenes de inmunoglobulina humana contenidos dentro del animal transgénico funcionan correctamente a lo largo de toda la ruta de desarrollo de células B, que conduce al cambio de isotipo. Por consiguiente, en este procedimiento, estos transgenes se construyen para producir cambio de isotipo y uno o más de lo siguiente: (1) expresión de alto nivel y específica del tipo de célula (2) reordenación génica funcional, (3) activación de y respuesta a exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señal, (6) hipermutación somática, y (7) dominación del locus de anticuerpo de transgén durante la respuesta inmunitaria.

- Un requisito importante para la función del transgén es la generación de un repertorio de anticuerpos primarios que es suficientemente diverso para producir una respuesta inmunitaria secundaria para una amplia variedad de antígenos. El gen de cadena pesada reordenado consiste en un exón de péptido de señal, un exón de región variable y una matriz en tándem de regiones constantes de múltiple dominio, cada una de las cuales es codificada por varios exones. Cada uno de los genes de región constante codifica la parte constante de una clase diferente de inmunoglobulinas. Durante el desarrollo de las células B, se eliminan las regiones constantes próximas de la región V conduciendo a la expresión de nuevas clase de cadena pesada. Para cada clase de cadena pesada, los patrones alternativos de empalme de ARN dan lugar tanto a inmunoglobulinas transmembrana y segregadas.

- El locus de cadena pesada humana consiste en aproximadamente 200 segmentos génicos V que abarcan 2 Mb, aproximadamente 30 segmentos génicos D que abarcan aproximadamente 40 kb, seis segmentos J agrupados dentro de un intervalo de 3 kb, y nueve segmentos génicos de región constante extendidos a lo largo aproximadamente 300 kb. El locus completo abarca aproximadamente 2,5 Mb de la parte distal del brazo largo del cromosoma 14. Los fragmentos de transgén de cadena pesada que contienen miembros de las seis de las familias de V_H conocidas, los segmentos génicos de D y J, así como las regiones constantes mu, delta, gamma 3, gamma 1 y alfa 1 se conocen (Berman y col., 1988). Se construyen de manera similar fragmentos genómicos que contienen todos los segmentos génicos necesarios y las secuencias reguladoras de un locus de cadena ligera humana.

- La expresión de transgenes pesados y ligeros de inmunoglobulina reordenados satisfactoriamente tiene normalmente un efecto dominante al eliminar la reordenación de los genes endógenos de inmunoglobulina en el animal no humano transgénico. Sin embargo, en algunas realizaciones, es deseable realizar la inactivación completa de locus Ig endógeno de modo que no se puedan formar cadenas híbridas de inmunoglobulina que comprendan una región variable humana y una región constante no humana (p. ej., murina), por ejemplo por trans-cambio entre las secuencias Ig endógenas y de transgén. Usando tecnología de células madre embrionarias y recombinación homóloga, se puede eliminar fácilmente el repertorio de inmunoglobulina endógeno. Además, la eliminación de genes Ig endógenos se puede llevar a cabo usando una variedad de técnicas tal como tecnología antisentido.

- En otros aspectos de la invención puede ser conveniente producir una inmunoglobulina trans-cambiada. Los anticuerpos que comprenden dichas inmunoglobulinas transcambiadas quiméricas se pueden usar para una variedad de aplicaciones cuando es deseable tener una región constante no humana (p. ej., murina), p. ej., para retención de funciones efectoras en el hospedante. La presencia de una región constante murina puede dar ventajas con respecto a una región constante humana, por ejemplo, para proporcionar funciones efectoras murinas (p. ej., ADCC, fijación de complemento murino) de modo que este anticuerpo quimérico se pueda ensayar en un modelo de enfermedad de ratón. Posteriormente al ensayo animal, se puede aislar la secuencia que codifica la región variable humana, p. ej., por amplificación por PCRTM o clonación de cADN de la fuente (clon de hibridoma), y empalmar con una secuencia que codifique una región constante humana deseada para codificar un anticuerpo de secuencia

humana más adecuado para uso terapéutico humano.

B6. Mutagénesis por PCR™

- 5 La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil en la preparación de anticuerpos individuales a través de mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica proporciona además una capacidad fácil para preparar y ensayar variantes de secuencia, que incorporan una o más de las consideraciones anteriores, ya sea humanización o no, al introducir uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en el ADN.
- 10 Aunque muchos procedimientos son adecuados para usar en mutagénesis, en general ahora se prefiere el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR™). Esta tecnología ofrece un procedimiento rápido y eficaz para introducir mutaciones deseadas en una secuencia dada de ADN. El siguiente texto describe en particular el uso de PCR™ para introducir mutaciones puntuales en una secuencia, como se puede usar para cambiar el aminoácido codificado por la secuencia dada. También son adecuadas las adaptaciones de este procedimiento para introducir
- 15 sitios de enzimas de restricción en una molécula de ADN.

En este procedimiento, se diseñan oligonucleótidos sintéticos para incorporar una mutación puntual en un extremo de un segmento amplificado. Después de la PCR™, los fragmentos amplificados se hacen de extremos romos por tratamiento con fragmentos Klenow, y los fragmentos de extremos romos después se ligan y subclonan en un vector

20 para facilitar el análisis de secuencia.

Para preparar el ADN molde que uno desea mutagenizar, el ADN se subclona en un vector de número de copias alto, tal como pUC19, usando sitios de restricción que flanquean el área que se va a mutar. Entonces se prepara el ADN molde usando una miniprep plasmídica. Los cebadores oligonucleótidos adecuados que se basan en la

25 secuencia original, pero que contienen la mutación puntual deseada y que están flanqueados en el extremo 5' por un sitio de enzima de restricción, se sintetizan usando un sintetizador automatizado. En general, se requiere que el cebador sea homólogo al ADN molde en aproximadamente 15 bases más o menos. Los cebadores se pueden purificar por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante, aunque esto no es absolutamente necesario para usar en PCR™. El extremo 5' de los oligonucleótidos entonces se debe fosforilar.

30 El ADN molde se debe amplificar por PCR™, usando los cebadores oligonucleótido que contienen las mutaciones puntuales deseadas. La concentración de MgCl₂ en el tampón de amplificación en general será de aproximadamente 15 mM. En general se deben llevar a cabo aproximadamente 20-25 ciclos de PCR™ como sigue: desnaturalización, 35 segundos a 95°C; hibridación 2 minutos a 50°C; y extensión, 2 minutos a 72°C. La

35 PCR™ incluirá en general una última extensión de ciclo de aproximadamente 10 minutos a 72°C. Después de la etapa final de extensión, se deben añadir aproximadamente 5 unidades de fragmentos Klenow a la mezcla de reacción e incubar durante 15 minutos adicionales a aproximadamente 30°C. La actividad de exonucleasa de los fragmentos Klenow es necesaria para hacer los extremos romos y adecuados para la clonación de extremos romos.

40 La mezcla de reacción resultante se debe analizar en general por electroforesis en gel de agarosa o acrilamida no desnaturizante para verificar que la amplificación haya producido el producto previsto. Después se procesará la mezcla de reacción eliminando la mayoría de los aceites minerales, extrayendo con cloroformo para eliminar el aceite restante, extrayendo con fenol tamponado y después concentrando por precipitación con 100 % de etanol. Después, se debe digerir aproximadamente la mitad de los fragmentos amplificados con una enzima de restricción

45 que corta en las secuencias flanqueadoras usadas en los oligonucleótidos. Los fragmentos digeridos se purifican en un gel de agarosa de baja gelificación/fusión.

Para subclonar los fragmentos y comprobar la mutación puntual, se subclonarán los dos fragmentos amplificados en un vector adecuadamente digerido por ligación de extremo romos. Esto se usará para transformar *E. coli*, a partir de

50 la cual posteriormente se puede preparar el ADN plasmídico usando una miniprep. La parte amplificada del ADN plasmídico entonces se analizará por secuenciación de ADN para confirmar que se había generado la mutación puntual correcta. Esto es importante puesto que la ADN-polimerasa Taq puede introducir mutaciones adicionales en los fragmentos de ADN.

55 La introducción de una mutación puntual también puede realizarse usando etapas secuenciales de PCR™. En este procedimiento, los dos fragmentos que abarcan la mutación se asocian entre sí y se extienden por síntesis mutuamente cebada. Este fragmento después se amplifica por una segunda etapa de PCR™, evitando de este modo el ligado de extremos romos requerido en el protocolo anterior. En este procedimiento, se realizan como se describe anteriormente la preparación del ADN molde, la generación de los cebadores oligonucleótido y la primera

amplificación por PCRTM. En este procedimiento, sin embargo, los oligonucleótidos elegidos deben ser homólogos al ADN molde para un tramo de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 bases y también deben soplarse entre sí aproximadamente 10 bases o más.

- 5 En la segunda amplificación por PCRTM, se usará cada fragmento amplificado y cada cebador de secuencia de flanco y se llevará a cabo la PCRTM durante entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 ciclos, usando las condiciones descritas antes. Nuevamente se subclonarán los fragmentos y se comprobará que sea correcta la mutación puntual usando las etapas resumidas anteriormente.
- 10 Al usar cualquiera de los procedimientos anteriores, en general se prefiere introducir la mutación amplificando un fragmento tan pequeño como sea posible. Por su puesto, los parámetros tal como la temperatura de fusión del oligonucleótido, puesto que en general están influidos por el contenido de GC y la longitud del oligo, también se deben considerar de manera cuidadosa. La ejecución de estos procedimientos, y su optimización si en necesario, será bien conocida por el experto en la técnica y se describen adicionalmente en varias publicaciones tales como
- 15 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995.

Cuando se realiza la mutagénesis específica del sitio, se puede usar la tabla A como una referencia.

Tabla A

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

20

B7. Fragmentos y derivados de anticuerpo

- Independientemente de la fuente del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 original de la invención, se puede usar en la presente invención el anticuerpo intacto, multímeros de anticuerpo, o uno cualquiera
- 25 de una variedad de regiones funcionales de unión al antígeno del anticuerpo. Las regiones funcionales de ejemplo incluyen fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno tal como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio individual (DAB), dímero de TandAb, Fv, scFv (Fv de cadena individual), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minianticuerpos, dianticuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y similares. Las técnicas para preparar dichas construcciones son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen
- 30 adicionalmente en el presente documento.

- En la elección de la construcción de anticuerpo pueden influir varios factores. Por ejemplo, la vida media prolongada puede ser resultado de la readsorción activa de anticuerpos intactos dentro del riñón, una propiedad de la pieza Fc de inmunoglobulina. Por lo tanto, se espera que los anticuerpos basados en IgG presenten depuración sanguínea
- 35 más lenta que sus homólogos de Fab'. Sin embargo, las composiciones basadas en el fragmento Fab' en general presentarán mejor capacidad de penetración de tejido.

Si se desea, se podrían seleccionar regiones Fc particulares para proporcionar longevidad. Por ejemplo, véase el

documento WO 99/43713, que se refiere a dominios constante con semividas potenciadas en la circulación logradas por unión sustancialmente reducida a los receptores de $Fc\gamma$, $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$ (Fridman, 1991). Además, la patente de EE.UU. n° 7.083.784 se refiere a dominios constantes modificados con mayores semividas que resultan de las modificaciones que aumentar su afinidad para el $FcRn$ (receptor Fc neonatal). Las técnicas de la patente de EE.UU. n° 7.083.784 se pueden aplicar para crear anticuerpos con mejor longevidad, ya sea con o sin funciones efectoras sustanciales.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpo por proteólisis de la inmunoglobulina humana completa por la tiolproteasa no específica, papaína. La digestión con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados "fragmentos Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un "fragmento Fc " residual.

Primero se debe activar la papaína reduciendo el grupo sulfhidrilo en el sitio activo con cisteína, 2-mercaptoetanol o ditiotreitól. Se deben eliminar metales pesados en la enzima concentrada por quelación con EDTA (2 mM) para asegurar la actividad enzimática máxima. Normalmente se mezclan juntas la enzima y el sustrato en la relación de 1:100 en peso. Después de la incubación. La reacción se puede detener por alquilación irreversible del grupo tiol con yodoacetamina o simplemente por diálisis. La terminación de la digestión se debe monitorizar por SDS-PAGE y separar las diferentes fracciones por cromatografía de proteína A-Sefarosa o intercambio iónico.

El procedimiento habitual para la preparación de fragmentos $F(ab')_2$ a partir de IgG de origen humano es proteólisis limitada por la enzima pepsina. Las condiciones, exceso de anticuerpo 100x en p/p en tampón de acetato a pH 4,5, 37°C, sugieren que el anticuerpo se escinde en el lado C-terminal del enlace de disulfuro inter-cadenas pesadas. Las velocidades de digestión de IgG de ratón pueden variar con la subclase y se deben elegir las condiciones para evitar cantidades significativas de IgG completamente degradada. En particular, la IgG_{2b} es susceptible de degradación completa. Las otras clases requieren diferentes condiciones de incubación para producir resultados óptimos, todos los cuales se conocen en la técnica.

El tratamiento con pepsina de anticuerpos intactos produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía es capaz de entrecruzar el antígeno. Las condiciones de ejemplo para la digestión de IgG por pepsina requieren condiciones que incluyen diálisis en un tampón de acetato 0,1 M, pH 4,5, y después incubación durante 4 horas con pepsina al 1 % p/p; la digestión de IgG_1 y IgG_{2a} se mejora si se dializa primero contra tampón de formiato 0,1 M, pH 2,8, a 4°C, durante 16 horas seguido de tampón de acetato. La IgG_{2b} da resultados más consistentes con incubación en proteasa V8 estafilocócica (3 % p/p) en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,8, durante 4 horas a 37°C.

Un fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpo.

Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento al antígeno. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación fuerte no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . De manera colectiva, las seis regiones hipervariables (CDR) confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables (CDR) específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno.

Los fragmentos "Fv monocatenarios" o "sFv" o "scFv" de anticuerpo comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. En general, el polipéptido de Fv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

Se hace referencia a las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y el uso de regiones funcionales de unión al antígeno de los anticuerpos, que incluyen los fragmentos scFv, Fv, Fab', Fab y $F(ab')_2$, de los anticuerpos dirigidos contra VEGF: patentes de EE.UU. n° 5.855.866; 5.965.132; 6.051.230; 6.004.555; 5.877.289; y 6.093.399. También se hace referencia al documento WO 98/45331 con el propósito de incluir descripción y enseñanza incluso adicional para la preparación

de regiones variables, hipervariables y determinantes de complementariedad (CDR) de anticuerpos.

Los "fragmentos bivalentes" son fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido ($V_H - V_L$). Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dos dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los fragmentos bivalentes se describen en los documentos EP 404.097 y WO 93/11161. Los "anticuerpos lineales", que pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$) que forman un par de regiones de unión al antígeno, como se describe en Zapata y col. (1995).

Al usar un fragmento Fab' o de unión al antígeno de un anticuerpo, con los beneficios que acompañan en la penetración en el tejido, pueden derivarse ventajas adicionales de la modificación del fragmento para aumentar su semivida. Se puede usar una variedad de técnicas, tales como manipulación o modificación de la propia molécula del anticuerpo, y también conjugación con vehículos inertes. Cualquier conjugación con el único propósito de aumentar la semivida, en lugar de suministrar un agente a un objetivo, se debe planear cuidadosamente ya que los fragmentos Fab' y otros se eligen para penetrar tejidos. Sin embargo, se contempla la conjugación a polímeros no proteínicos, tal como PEG y similares.

Por lo tanto las modificaciones diferentes de la conjugación se basan en la modificación de la estructura del fragmento de anticuerpo para volverlo más estable, y/o para reducir la velocidad del catabolismo en el cuerpo. Un mecanismo para dichas modificaciones es el uso de D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos. Los expertos en la técnica entenderán que la introducción de dichas modificaciones debe ser seguida de ensayo riguroso de la molécula resultante para asegurarse que todavía retiene las propiedades biológicas deseadas. Las modificaciones estabilizadoras adicionales incluyen el uso de la adición de restos estabilizantes ya sea al extremo N-terminal o el C-terminal o ambos, que en general se usa para prolongar la semivida de moléculas biológicas. Solo a modo de ejemplo, se pueden desear modificar los extremos por acilación o aminación.

Las modificaciones moderadas tipo conjugación para usar con la presente invención incluyen incorporar un epítipo de unión al receptor de recuperación en el fragmento de anticuerpo. Las técnicas para lograr esto incluyen mutación de la región adecuada del fragmento de anticuerpo o incorporación del epítipo como un marcador peptídico que se une al fragmento de anticuerpo. Se hace referencia al documento WO 96/32478 para el propósito de ejemplificar mejor esta tecnología. Los epítopos de unión a receptor de recuperación típicamente son regiones de tres o más aminoácidos de uno o dos bucles del dominio Fc que se transfieren a la posición análoga en el fragmento de anticuerpo. Los epítopos de unión al receptor de recuperación del documento WO 98/45331 se pueden usar con la presente invención.

B8. Ensayos de unión y funcionales

Aunque la presente invención tiene utilidad significativa en regímenes de tratamiento de animales y seres humanos, también tiene muchos otros usos prácticos, incluyendo muchos usos *in vitro*. Algunos de estos usos están relacionados las propiedades específicas de unión de los anticuerpos humanos o inmunoconjugados. Ya que todos los compuestos de la invención incluyen al menos un componente de unión al VEGF, se pueden usar prácticamente en todas las realizaciones de unión en las que se pueda usar cualquier anticuerpo dirigido contra VEGF.

La presencia de un agente unido, cuando sea relevante, aunque proporciona propiedades ventajosas, no anula la utilidad de las regiones de anticuerpo humano en un ensayo de unión. Los ensayos útiles de unión adecuadamente incluyen, por lo tanto, los usados habitualmente en la técnica, tales como inmunotransferencias, transferencias Western, transferencias en mancha, RIA, ELISA, inmunohistoquímica, separación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y similares, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Algunos ensayos de unión estándar son aquellos en los cuales se inmoviliza un antígeno sobre una matriz de soporte sólido, p. ej., nitrocelulosa, nailon o una combinación de los mismos, tales como en inmunotransferencias, transferencias Western y ensayos relacionados. Otros ensayos importantes son los ELISA. Todos dichos ensayos se pueden adaptar fácilmente para usar en la detección de VEGF, como se puede aplicar en el diagnóstico de una enfermedad angiogénica. Los agentes de la invención también se pueden usar junto con bloques de tejido tanto recién congelados, fijados en formalina como insertados en parafina en inmunohistoquímica; en separación celular activada por fluorescencia, citometría de flujo o microfluorometría de flujo; en inmunoprecipitación; en realizaciones

de purificación de antígeno, tales como cromatografía de afinidad, incluso incluyendo, en casos de anticuerpos biespecíficos, la purificación rápida en una etapa de uno o más antígenos al mismo tiempo; y en muchos otros ensayos de unión que conocerán los expertos en la materia dada la información presentadas en el presente documento.

5

Los usos prácticos adicionales de los presentes anticuerpos humanos son como controles en ensayos funcionales. Estos incluyen muchos ensayos y sistemas in vitro y ex vivo, así como estudios de modelos de animales. Puesto que las propiedades de unión y funcionales de los anticuerpos humanos de la invención son en particular específicas, es decir, inhiben la unión del VEGF a y la señalización por VEGFR2, pero no VEGFR1, estos usos de "control" son actualmente sumamente valiosos. Los ensayos que se benefician de una aplicación práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, ensayos relacionados con el crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF, fosforilación inducida por VEGF y permeabilidad vascular inducida por VEGF, así como el ensayo de micropocillo corneal de neovascularización y el ensayo de membrana corio-alantoica de pollo (CAM). Estos sistemas de ensayo también se pueden desarrollar en ensayos in vitro o ex vivo de cribado de fármacos, en donde la presente provisión de materiales biológicos con propiedades bien definidas es en particular importante.

C. Inmunoconjugados

Aunque la presente invención proporciona anticuerpos humanos desnudos o no conjugados, sorprendentemente eficaces para usar en procedimientos antiangiogénicos, también se proporcionan de este modo inmunoconjugados, inmunotoxinas y coagulandos de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2. Los agentes actualmente preferidos para usar en los conjugados terapéuticos de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, son agentes radioterapéuticos (como se ilustra por los radiodiagnósticos descritos en el presente documento), agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes antitubulina, agentes anticelulares o citotóxicos, citoquinas, quimioquinas, inhibidores de ATPasa tipo V y coagulantes (factores de coagulación).

Para generar inmunoconjugados, inmunotoxinas y coagulandos, se puede usar expresión recombinante para crear una proteína de fusión, como conocen los expertos en la materia y se describe adicionalmente en el presente documento. Igualmente, se pueden generar inmunoconjugados, inmunotoxinas y coagulandos usando puente de avidina:biotina o cualquiera de las tecnologías de conjugación química y de reticuladores, desarrolladas con referencia a los conjugados de anticuerpo.

C1. Agentes tóxicos y anticelulares

35

Para algunas aplicaciones, los agentes terapéuticos serán agentes citotóxicos o farmacológicos, en particular agentes citotóxicos, citostáticos o de otro modo anticelulares, que tienen la capacidad de matar o suprimir el crecimiento o división celular de células endoteliales. En general, estos aspectos de la invención contemplan el uso de cualquier agente farmacológico que se pueda conjugar con un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, y suministrar en forma activa al endotelio seleccionado.

40

Los agentes anticelulares de ejemplo incluyen agentes quimioterapéuticos, así como citotoxinas. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar incluyen: hormonas, tal como esteroides; antimetabolitos, tales como arabinósido de citosina, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides de la vinca; demecolcina; etopósido; mitramicina; agentes alquilantes antitumorales, tales como clorambucilo o melfalano. Otras realizaciones pueden incluir agentes tales como citoquinas. Básicamente se puede usar cualquier agente anti celular, siempre que se pueda conjugar o asociar satisfactoriamente con un anticuerpo de una manera que permitirá su direccionamiento, internalización, liberación y/o presentación a los componentes sanguíneos en el sitio de las células endoteliales objetivo.

50

Puede haber circunstancias, tal como cuando el antígeno objetivo no se internaliza por una ruta consistente con intoxicación eficaz por el compuesto tóxico, donde se deseará dirigir los agentes quimioterapéuticos, tales como fármacos antitumorales, citoquinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, hormonas, y similares. Ahora se han conjugado satisfactoriamente una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros farmacológicos con anticuerpos y se ha mostrado que funcionan de manera farmacológica, incluyendo doxorubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α -amanitina.

55

En otras circunstancias, se puede eliminar cualquier potencial efecto secundario de la terapia basada en citoquinas mediante el uso de inhibidores de síntesis de ADN, tales como daunorubicina, doxorubicina, adriamicina, y similares.

Por lo tanto, estos agentes son ejemplos preferidos de agentes anticelulares para usar en la presente invención. En términos de agentes citostáticos, dichos compuestos en general alteran el ciclo celular natural de una célula objetivo, preferiblemente de modo que las células es sacada del ciclo celular.

5 Se conoce una amplia variedad de agentes citotóxicos que se pueden conjugar con los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2. Los ejemplos incluyen numerosas toxinas útiles derivadas de plantas, hongos o bacterias, que, a modo de ejemplo, incluyen varias toxinas de cadena A, en particular cadena A de ricina; proteínas inactivadoras de ribosoma, tal como saporina o gelonina; α -sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tales como ribonucleasa placentaria; toxina de difteria; y exotoxina de pseudomonas, por nombrar
10 unos pocos.

Se hace referencia al libro de toxinas 1992 bien conocido, "Genetically Engineered Toxins", editado por Arthur E. Frankel, incluyendo el apéndice, que incluye las secuencias primarias de aminoácidos de un gran número de toxinas, con el propósito de describir más y permitir el uso de toxinas en construcciones dirigidas.

15 De las toxinas, se prefieren las cadenas A de gelonina y ricina. El resto de toxina más preferido para usar con estas es la cadena A de toxina que se ha tratado para modificar o eliminar restos de carbohidrato, la llamada cadena A desglicosilada (dgA). Se prefiere la cadena A de ricina desglicosilada debido a su extrema potencia, larga semivida, y debido a que es económicamente factible de fabricar a un grado y escala clínica.

20 Puede ser conveniente desde un punto de vista farmacológico usar la molécula más pequeña posible que proporcione sin embargo una respuesta biológica adecuada. Por lo tanto, se puede desear usar péptidos de cadena A más pequeños que proporcionarán una respuesta anticelular adecuada. Para este fin, se ha descubierto que la cadena A de ricina se puede "truncar" por eliminación de 30 aminoácidos N-terminales por Nagarase (Sigma), y
25 todavía retener una actividad adecuada de toxina. Se propone que cuando se desee, esta cadena A truncada se puede usar en conjugados de acuerdo con la invención.

Alternativamente, se puede encontrar que la aplicación de tecnología de ADN recombinante a la parte de cadena A de toxina proporcionará beneficios adicionales de acuerdo con la invención. Ya que se ha logrado la clonación y
30 expresión de la cadena A de ricina biológicamente activa, ahora se puede identificar y preparar péptidos más pequeños, o de otro modo variantes, que sin embargo presentan una actividad adecuada de toxina. Además, el hecho de que ahora se haya clonado la cadena A de ricina permite la aplicación de la mutagénesis dirigida, por la cual se pueden preparar y cribar fácilmente péptidos derivados de cadena A y obtener restos útiles adicionales para usar en relación con la presente invención.

35 **C2. Factores de coagulación**

El anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención se puede unir a un componente que es capaz de estimular directa o indirectamente la coagulación, para formar un coaguligando. Aquí, los
40 anticuerpos se pueden unir directamente al coagulante o factor de coagulación, o se pueden unir a una segunda región de unión que se une y después libera el coagulante o factor de coagulación. Como se usa en el presente documento, los términos "coagulante" y "factor de coagulación" se usan cada uno para referirse a un componente que es capaz de estimular directa o indirectamente la coagulación en condiciones adecuadas, preferiblemente cuando se proporciona en un entorno específico in vivo, tal como la vasculatura tumoral.

45 Los factores de coagulación preferidos son composiciones del factor tisular, tales como TF truncado (tTF), moléculas de TF diméricas, multiméricas y mutantes. "TF truncado" (tTF) se refiere a construcciones de TF que se vuelven deficientes en la unión a membrana por eliminación de suficientes secuencias de aminoácidos para realizar este cambio en la propiedad.

50 Una "cantidad suficiente" en este contexto es una cantidad de secuencia de aminoácidos transmembrana originalmente suficiente para que la molécula de TF entre en la membrana, o para mediar de otro modo la unión funcional a membrana de la proteína de TF. La eliminación de dicha "cantidad suficiente de secuencia que abarca transmembrana" crea así una proteína de factor tisular truncada, o polipéptido, deficiente en la capacidad de unión a
55 membrana de fosfolípidos, de modo que la proteína es sustancialmente una proteína soluble que no se une significativamente a membranas de fosfolípidos. Por lo tanto, el TF truncado sustancialmente no puede convertir el Factor VII en Factor VIIa en un ensayo de TF estándar, y todavía retiene la llamada actividad catalítica que incluye activar el Factor X en presencia del Factor VIIa.

Se hace referencia a la patente de EE.UU. n° 5.504.067 para el propósito de describir más dichas proteínas truncadas del factor tisular. Preferiblemente, los factores tisulares para usar en estos aspectos de la presente invención carecerán en general de las regiones transmembrana y citosólicas (aminoácidos 220-263) de la proteína. Sin embargo, no hay necesidad de que las moléculas truncadas de TF se limiten a moléculas de la longitud exacta de 219 aminoácidos.

Las composiciones de factor tisular también pueden ser útiles como dímeros. Se puede preparar cualquiera de las construcciones truncadas, mutadas u otras de factor tisular en una forma dimérica para usar en la presente invención. Como conocen los expertos en la materia, dichos dímeros de TF se pueden preparar usando las técnicas estándar de biología molecular y expresión recombinante, en las cuales se preparan dos regiones codificantes en el marco y son expresadas de un vector de expresión. Igualmente, se pueden usar varias tecnologías de conjugación química en relación con la preparación de dímeros de TF. Los monómeros individuales de TF se pueden derivatizar antes de la conjugación. Todas dichas técnicas serán fácilmente conocidas por los expertos en la materia.

Si se desea, los dímeros o multímeros de factor tisular se pueden unir mediante un enlace biológicamente liberable, tal como un ligador escindible selectivamente o secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se contemplan ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para una enzima preferiblemente localizada o activa dentro de un entorno tumoral. Las formas de ejemplo de dichos ligadores peptídicos son aquellas que son escindidas por uroquinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa, o una metaloproteínasa, tal como colagenasa, gelatinasa o estromelisin.

En algunas realizaciones, los dímeros de factor tisular pueden comprender además una parte de inserción en membrana hidrófoba impedida, para estimular posteriormente la asociación funcional del factor tisular con la membrana de fosfolípidos, pero sólo en ciertas condiciones definidas. Como se describe en el contexto de los factores tisulares truncados, en general las secuencias de asociación a membranas hidrófobas, son tramos de aminoácidos que promueven la asociación con el entorno de fosfolípidos debido a su naturaleza hidrófoba. Igualmente, se pueden usar ácidos grasos para proporcionar el potencial resto de inserción en membrana.

Dichas secuencias de inserción en membrana pueden estar localizadas ya sea en el extremo N o el extremo C de la molécula de TF, o en general anexadas en cualquier otro punto de la molécula siempre que su unión a la misma no impida las propiedades funcionales de la construcción de TF. El objetivo del resto de inserción impedido, es que permanezca no funcional hasta que la construcción de TF este localizada dentro del entorno tumoral, y permita que el anexo hidrófobo llegue a ser accesible y promueva incluso además la asociación física con la membrana. Nuevamente, se contempla que los enlaces biológicamente liberables y las secuencias selectivamente escindibles serán en particular útiles a este respecto, con el enlace o secuencia que se escinde solo o se modifica de otro modo en la localización dentro del entorno tumoral y exposición a enzimas particulares u otras moléculas bioactivas.

En otras realizaciones, las construcciones de tTF pueden ser multiméricas o poliméricas. En este contexto, una "construcción polimérica" contiene 3 o más construcciones de factor tisular. Una "construcción de TF multimérica o polimérica" es una construcción que comprende una primera molécula de TF o derivado, operativamente unida a al menos una segunda y una tercera molécula de TF o derivado. Los multímeros pueden comprender entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 de dichas moléculas de TF. Las unidades individuales de TF dentro de los multímeros o polímeros también se pueden unir por ligadores peptídicos selectivamente escindibles u otros enlaces biológicamente liberables, según se desee. De nuevo, como con los dímeros de TF descritos anteriormente, las construcciones se pueden hacer fácilmente usando ya sea manipulación recombinante y expresión o usando química de síntesis estándar.

Las construcciones de TF incluso adicionales útiles en el contexto de la presente invención son aquellos mutantes deficientes en la capacidad para activar el Factor VII. Estos "mutantes de activación del Factor VII" se definen en general en el presente documento como mutantes de TF que se unen al Factor VII/VIIa funcional, activan proteolíticamente el Factor X, pero carecen sustancialmente de la capacidad de activar proteolíticamente el Factor VII. Por consiguiente, dichas construcciones son mutantes de TF que carecen de la actividad de activación del Factor VII.

La capacidad de dichos mutantes de activación del Factor VII para funcionar para promover la coagulación específica de tumor, se basa en su distribución específica a la vasculatura tumoral, y en la presencia del Factor VIIa a bajos niveles en plasma. Tras la administración de dicho conjugado de mutante de activación del Factor VII, el mutante se localizará dentro de la vasculatura de un tumor vascularizado. Antes de la localización, el mutante de TF será en general incapaz de promover la coagulación en cualquier otro sitio del cuerpo, basado en su incapacidad

para convertir el Factor VII en el Factor VIIa. Sin embargo, tras la localización y acumulación dentro de la región tumoral, el mutante entonces encontrará suficiente Factor VIIa del plasma con el fin de iniciar la ruta de coagulación extrínseca, que conduce a trombosis específica de tumor. También se podría administrar Factor VIIa exógeno al paciente.

5

Se puede preparar uno cualquiera o más de una variedad de mutantes de activación del Factor VII y usar en relación con la presente invención. Existe una cantidad significativa de conocimiento científico con respecto a los sitios de reconocimiento en la molécula de TF para el Factor VII-VIIa. Por lo tanto, se entenderá que la región de activación del Factor VII está en general entre aproximadamente el aminoácido 157 y aproximadamente el aminoácido 167 de la molécula de TF. Sin embargo, está contemplado que los restos fuera de esta región también pueden demostrar ser relevantes para la actividad de activación del Factor VII, y por lo tanto se puede considerar introducir mutaciones en uno cualquiera o más de los restos localizados en general entre aproximadamente el aminoácido 106 y aproximadamente el aminoácido 209 de la secuencia de TF (documentos WO 94/07515; WO 94/28017).

10

15 Se puede usar una variedad de otros factores de coagulación en relación con la presente invención, como se ilustra mediante los agentes expuestos más adelante. En la presente invención se pueden usar trombina, Factor V/Va y derivados, Factor VIII/VIIIa y derivados, Factor IX/IXa y derivados, Factor X/Xa y derivados, Factor XI/XIa y derivados, Factor XII/XIIa y derivados, Factor XIII/XIIIa y derivados, activador de Factor X y activador de Factor V.

20 Para usar en esta invención está contemplado el activador de Factor X de veneno de víbora de Russell. También se han producido anticuerpos monoclonales específicos para el activador de Factor X presente en el veneno de víbora de Russell, y se podrían usar para suministrar de manera específica el agente como parte de un ligando de unión biespecífico.

25 El tromboxano A₂ se forma de endoperóxidos por las acciones secuenciales de las enzimas ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa en microsomas de plaquetas. El tromboxano A₂ es generado fácilmente por plaquetas y es un potente vasoconstrictor, en virtud de su capacidad para producir agregación de plaquetas. Tanto el tromboxano A₂ como los análogos activos del mismo están contemplados para usar en la presente invención.

30 También se pueden usar tromboxano sintasa, y otras enzimas que sintetizan prostaglandinas activadoras de plaquetas, como "coagulantes" en el presente contexto. Los anticuerpos monoclonales contra, y la purificación por inmunoafinidad de, tromboxano sintasa son conocidos; como lo es el cADN para tromboxano sintasa humana.

La α₂-antiplasmina, o inhibidor de α₂-plasmina, es un inhibidor de proteinasa presente de manera natural en el plasma humano que funciona para inhibir de manera eficaz la lisis de coágulos de fibrina inducida por activador de plasminógeno. La α₂-antiplasmina es un inhibidor en particular potente, y está contemplada para usar en la presente invención.

Puesto que está disponible la secuencia de cADN para α₂-antiplasmina, se prefieren proteínas de fusión y/o expresión recombinante. También están disponibles anticuerpos monoclonales contra α₂-antiplasmina que se pueden usar en las realizaciones de ligando de unión biespecífico de la invención. Estos anticuerpos se pueden usar tanto para suministrar α₂-antiplasmina exógena al sitio objetivo o como para almacenar α₂-antiplasmina endógena y concentrarla dentro de la región objetivo.

45 **C3. Fármacos antitubulina**

Una variedad de fármacos ejerce sus efectos mediante la interferencia con la actividad de la tubulina. Puesto que las funciones de la tubulina son esenciales para la mitosis y viabilidad celular, algunos "fármacos antitubulina" son poderosos agentes quimioterapéuticos. El o los "fármacos antitubulina", como se usa en el presente documento, significa cualquier agente, fármaco, profármaco o combinación de los mismos que inhiba la mitosis celular, preferiblemente inhibiendo directa o indirectamente las actividades de tubulina necesarias para la mitosis celular, preferiblemente polimerización o despolimerización de tubulina.

Algunos de los fármacos antitubulina mejor conocidos y actualmente preferidos para usar con la presente invención son colquicina; taxanos, tal como taxol (paclitaxel) y docetaxel; alcaloides de vinca, tal como vinblastina, vincristina y vindescina; y combretastatinas. Otros fármacos antitubulina adecuados son citocalasinas (incluyendo B, J, E), dolastatina, auristatina PE, paclitaxel, ustiloxina D, rizoxina, 1069C85, colcemid, alendazol, azatoxina y nocodazol.

Como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.892.069, 5.504.074 y 5.661.143, las combretastatinas son

derivados de estradiol que inhiben en general la mitosis celular. Las combretastatinas de ejemplo que se pueden usar junto con la invención incluyen las basadas en combretastatina A, B y/o D y las descritas en las patentes de EE.UU. nº 5.892.069. 5.504.074 y 5.661.143. Las combretastatinas A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3 y B-4 son ejemplo de los tipos anteriores.

5

Las patentes de EE.UU. nº 5.569.786 y 5.409.953 describen el aislamiento, caracterización estructural y síntesis de cada una de las combretastatinas A-1, A-2, A-3, B-1, B-2, B-3 y B-4 y formulaciones y procedimientos para usar estas combretastatinas para tratar el crecimiento neoplásico. Se puede usar una cualquiera o más de estas combretastatinas junto con la presente invención.

10

También se puede usar con el presente documento la combretastatina A-4, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.892.069. 5.504.074. 5.661.143 y 4.996.237. La patente de EE.UU. nº 5.561.122 describe además profármacos adecuadas de combretastatina A-4, que se contemplan para uso combinado con la presente invención.

15 La patente de EE.UU. nº 4.940.726 describe en particular lactonas macrocíclicas denominadas combretastatina D-1 y "Combretastatina D-2", cada una de las cuales se puede usar en combinación con las composiciones y procedimientos de la presente invención. La patente de EE.UU. nº 5.430.062 se refiere a derivados de estilbeno y análogos de combretastatina con actividad antineoplásica que se pueden usar en combinación con la presente invención.

20

C4. Agentes antiangiogénicos

La presente invención proporciona en particular antiangiogénicos combinados. Los anticuerpos humanos de la invención se pueden unir a una angiopoyetina (Davis y Yancopoulos, 1999; Holash y col., 1999), tal como
25 angiopoyetina-1 (Ang-1), angiopoyetina-2 (Ang-2), angiopoyetina-3 (ratón) o angiopoyetina-4 (humano) (Valenzuela y col., 1999; Kim y col., 1999).

Los antiangiogénicos de ejemplo para usar con el presente documento incluyen angiostatina y endostatina. La angiostatina se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.776.704; 5.639.725 y 5.733.876. La angiostatina es una
30 proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kD y aproximadamente 45 kD, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida reductor, que contiene aproximadamente las regiones 1 hasta 4 Kringle de una molécula de plasminógeno. En general la angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a aquella de un fragmento de plasminógeno murino empezando en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacta.

35

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre las especies. Por ejemplo, en la angiostatina humana, la secuencia de aminoácidos es sustancialmente similar a la secuencia del fragmento de plasminógeno murino descrito anteriormente, aunque una secuencia de angiostatina humana activa puede empezar en el aminoácido número 97 o 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano intacta. Además, se puede
40 usar plasminógeno humano, puesto que tiene actividad antiangiogénica similar, como se muestra en un modelo de tumor de ratón.

La angiostatina y la endostatina se han convertido en el foco de estudio intensivo, puesto que son los primeros inhibidores de la angiogénesis que han demostrado la capacidad no sólo de inhibir el crecimiento tumoral sino
45 también de producir remisión tumoral en ratones. Hay múltiples proteasas que se ha mostrado que producen angiostatina a partir de plasminógeno, incluyendo elastasa, metaloelastasa de macrófago (MME), matrilisina (MMP-7), y gelatinasa B/colagenasa tipo IV de 92 kDa (MMP-9).

La MME puede producir angiostatina a partir de plasminógeno en tumores y el factor estimulador de colonia de
50 granulocitos-macrófagos (GM-CSF) regula por aumento la expresión de MME por macrófagos que inducen la producción de angiostatina. La función de la MME en la generación de angiostatina está respaldada por el hallazgo de que la MME es, de hecho, expresada en muestras clínicas de carcinomas hepatocelulares de pacientes. Otra proteasa que se piensa que es capaz de producir angiostatina es la estromelisina-1 (MMP-3). Se ha mostrado que la MMP-3 produce fragmentos tipo angiostatina a partir de plasminógeno in vitro. Actualmente no está claro el
55 mecanismo de acción para la angiostatina, se tiene como hipótesis que se une a un receptor de la superficie celular no identificado en células endoteliales induciendo a la célula endotelial a sufrir muerte celular programada o detención mitótica.

La endostatina parece ser un agente antiangiogénesis y antitumoral incluso más poderoso y se prefiere en particular

para la unión a los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2. La endostatina es eficaz en producir remisiones en una serie de modelos de tumor en ratones. Los tumores que desarrollan resistencia a endostatina, y después de múltiples ciclos de tratamiento, los tumores entran a un estado inactivo durante el cual no aumentan en volumen. En este estado inactivo, aumentó el porcentaje de células tumorales que sufrían apoptosis, produciendo una población que permanece esencialmente del mismo tamaño.

La patente de EE.UU. n° 5.854.205, de Folkman y O'Reilly, se refiere a endostatina y su uso como un inhibidor de la proliferación de células endoteliales y angiogénesis. La proteína endostatina corresponde a un fragmento C-terminal de colágeno tipo XVIII, y la proteína se puede aislar de una variedad de fuentes. La patente de EE.UU. n° 5.854.205 también enseña que la endostatina puede tener una secuencia de aminoácidos de un fragmento de colágeno tipo XVIII, un colágeno tipo XV o esterasa pregástrica BOVMPE 1. Las combinaciones de endostatina con otras proteínas antiangiogénicas, en particular angiostatina, también se describen por la patente de EE.UU. n° 5.854.205, de modo que las composiciones combinadas son capaces de la remisión eficaz la masa de un tumor dependiente de angiogénesis.

La endostatina y la angiostatina, en particular la endostatina, son agentes preferidos para el suministro tumoral de acuerdo a la presente invención. También, la vasculostatina, canstatina y maspina son agentes preferidos. Se pueden preparar proteínas de fusión de endostatina, como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.342.221. También se pueden preparar diferentes formas de construcciones de endostatina químicamente unidas, nuevamente como se ilustra en la patente de EE.UU. n° 6.342.221.

C5. Agentes inductores de apoptosis

La presente invención también se puede usar para suministrar agentes que inducen apoptosis en cualquier célula dentro del tumor, incluyendo células tumorales y células endoteliales vasculares tumorales. Aunque muchos antineoplásicos pueden tener, como parte de su mecanismo de acción, un efecto inductor de apoptosis, se han descubierto, diseñado o seleccionado algunos agentes con este mecanismo primario, como se describe más adelante.

De muchas formas de cáncer se han descrito mutaciones en los genes supresores de tumor, tal como p53. La inactivación de p53 da como resultado un fallo para promover la apoptosis. Con este fallo, las células de cáncer progresan en la tumorigénesis, en lugar de llegar a ser destinadas a la muerte celular. Por lo tanto, también está contemplado el suministro de supresores tumorales para usar en la presente invención para estimular la muerte celular. Los supresores tumorales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a p53, gen de retinoblastoma (Rb), tumor de Wilm (WTI), bax-alfa, enzima convertidora de interleucina-1b y familia, gen MEN-1, neurofibromatosis, tipo 1 (NF1), inhibidor p16 de cdk, gen de cáncer colorrectal (DCC), gen de poliposis de adenomatosis familiar (FAP), gen supresor múltiple de tumores (MTS-1), BRCA1 y BRCA2.

Los preferidos para usar son los genes de p53 (patentes de EE.UU. n° 5.747.469; 5.677.178; y 5.756.455), retinoblastoma, BRCA1 (patentes de EE.UU. n° 5.750.400; 5.654.155; 5.710.001; 5.756.294; 5.709.999; 5.693.473; 5.753.441; 5.622.829; y 5.747.282), MEN-1 (número de acceso a GenBank U93236) y adenovirus E1A (patente de EE.UU. n° 5.776.743).

Otras composiciones que se pueden suministrar mediante los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 incluyen genes que codifican el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral, llamado TRAIL, y el polipéptido de TRAIL (patente de EE.UU. n° 5.763.223); la proteasa asociada a apoptosis de 24 kD de la patente de EE.UU. n° 5.605.826; factor 1 asociado a Fas, FAF1 (patente de EE.UU. n° 5.750.653). También se contempla para usar en estos aspectos de la presente invención proporcionar la enzima convertidora de interleucina-1 β y miembros de la familia, que también se ha descrito que estimulan la apoptosis.

También se pueden usar compuestos tales como derivados de carboestirilo (patentes de EE.UU. n° 5.672.603; y 5.464.833); péptidos apogénicos ramificados (patente de EE.UU. n° 5.591.717); inhibidores de fosfotirosina y análogos de fosfotirosina no hidrolizables (patentes de EE.UU. n° 5.565.491; y 5.693.627); agonistas de receptores retinoides RXR (patente de EE.UU. n° 5.399.586); e incluso antioxidantes (patente de EE.UU. n° 5.571.523). También se pueden unir inhibidores de tirosina-quinasa, tales como genisteína, a los agentes de la presente invención que se dirigen al receptor de superficie celular, VEGFR1 (respaldado por la patente de EE.UU. n° 5.587.459).

El "segundo activador derivado de mitocondrias de caspasa" (SMAC), también conocido como DIABLO, es una

proteína que se libera de la mitocondria durante la apoptosis y se une a una familia de proteínas llamadas “inhibidor de proteínas de apoptosis” (IAP). Los niveles de expresión de IAP están aumentados en una serie de tumores humanos. Por lo tanto, se han desarrollado como antineoplásicos antagonistas de IAP o miméticos de SMAC. Estos se pueden usar junto con la presente invención, tanto como conjugados como en terapias de combinación.

5

Los inhibidores de IAP de ejemplo incluyen los desarrollados basándose en la estructura cristalina de la interacción de SMAC con el dominio BIR3 de IAP unido a X (XIAP, también conocida como BIRC4) y los antagonistas de IAP monovalentes y bivalentes diseñados usando un procedimiento basado en estructura (Vince y col., 2007; Varfolomeev y col., 2007). También se pueden usar miméticos de SMAC diseñados para parecerse a los aminoácidos N-terminales de SMAC, que interactúan con el dominio BIR3 de XIAP (Petersen y col., 2007). Se ha mostrado que los miméticos de SMAC pueden inducir remisión de xenoinjertos sensibles de cáncer de pulmón humano como agentes individuales, permaneciendo 40 % de los animales tratados exentos de tumores (Petersen y col., 2007).

15 C6. Citoquinas

Las citoquinas y quimioquinas son ejemplos particulares de agentes para la unión a un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 de la presente invención. Se puede usar una variedad de citoquinas, que incluyen IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-13, TGF- β , M-CSF, G-CSF, TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, IFN- α , IFN- β . Las citoquinas más preferidas incluyen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , proteína quimioattractora de monocitos-1 (MCP-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) y proteína C-reactiva (CRP) y similares. Los ejemplos en particular preferidos son TNF α , inductores de TNF α , IL-2, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ y LEC.

Por ejemplo, se puede unir IL-12 a un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 y usar para redirigir las defensas del hospedante para atacar los vasos tumorales. La quimioquina LEC (quimioquina expresada en el hígado, también conocida como NCC-4, HCC-4 o LMC) es otro componente preferido (Giovarelli y col., 2000). La LEC es quimiotáctica para células dendríticas, monocitos, células T, células NK y neutrófilos y por lo tanto puede mejorar las respuestas antitumorales mediadas por el hospedante.

30

C7. Equivalentes biológicamente funcionales

Ahora se pueden hacer equivalentes, o incluso mejoras, de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención. Se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de dicho anticuerpo y obtener todavía una molécula que tenga características similares o igualmente deseables. Por ejemplo, se pueden sustituir algunos aminoácidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva. Estas consideraciones también aplican a toxinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis, coagulantes y similares.

Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de la proteína, se pueden hacer ciertas sustituciones de la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína (o por supuesto, la secuencia subyacente de ADN) y obtener sin embargo una proteína con propiedades similares (agonista). Por lo tanto, está contemplado que se pueden hacer varios cambios en la secuencia de los anticuerpos o agentes terapéuticos (o secuencias subyacentes de ADN) sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Se pueden producir equivalentes biológicos funcionales hechos por mutación de una secuencia subyacente de ADN, usando la información de codones proporcionada en el presente documento en la tabla A, y los detalles técnicos que respaldan la mutagénesis específica de sitio.

Los expertos en la materia también entienden bien que, inherente en la definición de una proteína o péptido “equivalente biológicamente funcional”, está el concepto que hay un límite al número de cambios que se pueden hacer dentro de una parte definida de la molécula y todavía dar como resultado una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Las proteínas y péptidos equivalentes biológicamente funcionales por lo tanto se definen en el presente documento como aquellas proteínas y péptidos en los cuales se pueden sustituir algunos, no la mayoría ni todos, los aminoácidos. Por supuesto, se puede hacer fácilmente una pluralidad de distintas proteínas/péptidos con diferentes sustituciones, y usar de acuerdo con la invención. Dichos péptidos “equivalentes biológicamente funcionales” se pueden considerar como ejemplos adicionales de secuencias “sustancialmente homólogas” como se describe en el presente documento.

Las sustituciones de los aminoácidos en general se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena

lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos pone de manifiesto que la arginina, lisina e histidina son todos restos con carga positiva; que la alanina, glicina y serina son de un tamaño similar; y que la fenilalanina, triptófano y tirosina tienen todos en general una forma similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, la arginina, lisina e histidina; la alanina, glicina y serina; y la fenilalanina, triptófano y tirosina; se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

Quando se han más cambios cuantitativos, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína en general se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que algunos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y todavía retienen una actividad biológica similar. Cuando se hacen cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén dentro de ± 2 , los que estén dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos.

Por lo tanto, se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tiene un valor similar de hidrofiliidad y obtener todavía una proteína biológicamente equivalente. Como se detalla en la patente de EE.UU. nº 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Quando se hacen cambios basándose en los valores de hidrofiliidad, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad estén dentro de ± 2 , son particularmente preferidos los que están dentro de ± 1 y son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de $\pm 0,5$.

C8. Proteínas de fusión y expresión recombinante

El anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o inmunconjugados de la presente invención se pueden preparar fácilmente como proteínas de fusión usando técnicas de biología molecular. Cualquier proteína de fusión se puede diseñar y hacer usando cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento y los conocidos en la técnica. La tecnología de proteínas de fusión se adapta fácilmente para preparar proteínas de fusión en las cuales se unan las dos partes por una secuencia peptídica selectivamente escindible. Se puede unir cualquier agente terapéutico al extremo del anticuerpo o a cualquier punto distinto de las CDR. Los agentes terapéuticos también se pueden preparar "de manera integral", en donde se asocian preferiblemente con un péptido selectivamente escindible para permitir la liberación del agente después direccionamiento.

El uso de técnicas de ADN recombinante para lograr estos extremos ahora es una práctica normal para los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas de síntesis y recombinación in vivo/recombinación genética. La síntesis de ADN y de ARN se puede realizar, adicionalmente, usando sintetizadores automáticos (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., 1989).

La preparación de dicha proteína de fusión en general conlleva la preparación de una primera y una segunda región codificante de ADN y el ligado funcional o la unión de dichas regiones, en el marco, para preparar una región codificante individual que codifica la proteína de fusión deseada. En el presente contexto, la secuencia de ADN del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 se unirá en el marco con una secuencia de ADN que codifica un agente terapéutico. En general no se cree que sea en particular relevante qué parte de la construcción se prepara como la región N-terminal o como la región C-terminal.

Una vez que se ha producido la región codificante deseada, se crea un vector de expresión. Los vectores de expresión contienen uno o más promotores en la dirección 5' de las regiones de ADN insertadas que actúan para promover la transcripción del ADN y por lo tanto para promover la expresión de la proteína recombinante codificada. Este es el significado de "expresión recombinante".

Para obtener una llamada versión "recombinante" del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención o inmunoconjugado del mismo, se expresa en una célula recombinante. La creación por ingeniería de segmento o segmentos de ADN para la expresión en un sistema procariota o eucariota se puede realizar por técnicas en general conocidas por los expertos en expresión recombinante. Se cree que se puede usar prácticamente cualquier sistema de expresión en la expresión de un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o construcciones de inmunoconjugado.

Dichas proteínas se pueden expresar satisfactoriamente en sistemas eucariotas de expresión, p. ej., células CHO, sin embargo, está contemplado que serán particularmente útiles los sistemas bacterianos de expresión, tal como *E. coli* pQE-60 para la preparación a gran escala y la posterior purificación del anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugados. Los cADN también se pueden expresar en sistemas bacterianos, siendo expresadas las proteínas codificadas como fusiones con α -galactosidasa, ubiquitina, glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*, y similares. Se cree que la expresión bacteriana tendrá ventajas frente a la expresión eucariótica en términos de facilidad de uso y de la cantidad de materiales obtenidos de este modo.

En términos de expresión microbiana, se hace referencia a las patentes de EE.UU. n° 5.583.013; 5.221.619; 4.785.420; 4.704.362; y 4.366.246, con el propósito de complementar incluso más la presente descripción en relación con la expresión de genes en células hospedantes recombinantes.

Los inmunoconjugados o anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, producidos de manera recombinante se pueden purificar y formular para administración humana. Alternativamente, se pueden suministrar ácidos nucleicos que codifican los inmunoconjugados mediante terapia génica. Aunque se puede usar ADN recombinante desnudo o plásmidos, se prefiere el uso de liposomas o vectores. La capacidad de ciertos virus para entrar en las células por endocitosis mediada por receptor y para integrarse en el genoma de la célula hospedante y expresar genes víricos de manera estable y eficaz, los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños en células de mamífero. Los vectores preferidos de terapia génica para usar en la presente invención en general serán vectores víricos.

Los retrovirus son prometedores como vectores de suministro de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma hospedante, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y siendo empaquetadas en líneas celulares especiales. También se pueden crear por ingeniería otros virus, tal como adenovirus, virus de herpes simple (HSV), citomegalovirus (CMV) y virus adeno-asociado (AAV), tales como los descritos por la patente de EE.UU. n° 5.139.941, para servir como vectores para transferencia génica.

Aunque algunos virus que pueden aceptar material genético extraño están limitados en el número de nucleótidos que pueden acomodar y en la variedad de células que pueden infectar, estos virus han demostrado que realizan satisfactoriamente la expresión génica. Sin embargo, los adenovirus no integran su material genético en el genoma del hospedante y por lo tanto no requieren la replicación del hospedante para la expresión génica, haciéndolos idealmente adecuados para expresión génica heteróloga rápida y eficaz. Son bien conocidas las técnicas para preparar virus infecciosos, defectuosos en la replicación.

En algunas realizaciones adicionales, el vector de terapia génica será HSV. Un factor que hace al HSV un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Debido a que el HSV es grande, la incorporación de múltiples genes o casetes de expresión es menos problemática que en otros sistemas víricos más pequeños. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias de control vírico con rendimiento variable (p. ej., temporal, resistencia) hace posible controlar la expresión en un mayor grado que en otros sistemas. También es una ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes empalmados, facilitando más manipulaciones genéticas. El HSV también es relativamente fácil de manipular y se puede cultivar hasta títulos altos.

Por supuesto, usando sistemas de suministro vírico, se deseará purificar el virión de manera suficiente para volverlo esencialmente libre de contaminantes indeseables, tales como partículas víricas interferentes defectuosas o endotoxinas y otros pirógenos de modo que no provocarán ninguna reacción indeseada en la célula, animal o individuo que recibe la construcción de vector. Un medio preferido para purificar el vector comprende el uso de gradientes de densidad flotante, tal como centrifugación por gradiente de cloruro de cesio.

C9. Conjugados de anticuerpo

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 se pueden conjugar a agentes anticelulares o citotóxicos, para preparar “inmunotoxinas”; o asociar operativamente con componentes que son capaces de estimular directa o indirectamente la coagulación, formando así un “coaguligando”. En los coaguligandos, el anticuerpo se puede unir directamente a un factor de coagulación directo o indirecto, o se puede unir a una segunda región de unión que se une y después libera un factor de coagulación directo o indirecto. El procedimiento de “segunda región de unión” usa en general un anticuerpo de unión a coagulante como una segunda región de unión, dando así como resultado una construcción de anticuerpo biespecífico. La preparación y uso de anticuerpos biespecíficos en general es bien conocida en la técnica, y se describe adicionalmente en el presente documento.

10

En la preparación de inmunotoxinas, coaguligandos y anticuerpos biespecíficos, se puede usar expresión recombinante. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo elegido se unen, en el marco, a las secuencias de ácido nucleico que codifican la toxina, coagulante o segunda región de unión, elegidas, para crear una unidad o vector de expresión. La expresión recombinante da como resultado la traducción del nuevo ácido nucleico, para producir el producto de proteína deseado. Aunque se usan ácidos nucleicos que codifican anticuerpo, en lugar de los ligandos de unión a proteína, el procedimiento recombinante es esencialmente el mismo que los descritos en lo que antecede.

15

Volviendo a la tecnología de conjugados, en general es bien conocida en la técnica la preparación de inmunotoxinas. Sin embargo, se pueden lograr ciertas ventajas a través de la aplicación de determinada tecnología preferida, tanto en la preparación de inmunotoxinas como en su purificación para la posterior administración clínica. Por ejemplo, aunque las inmunotoxinas basadas en IgG presentarán típicamente mejor capacidad de unión y depuración sanguínea más lenta que sus homólogos de Fab', en general, las inmunotoxinas basadas en fragmento Fab' presentarán mejor capacidad de penetración en tejido en comparación con las inmunotoxinas basadas en IgG.

20

Además, aunque se conocen numerosos tipos de ligadores que contienen enlaces disulfuro que se pueden usar satisfactoriamente para conjugar el resto de toxina con el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, en general se preferirán ciertos ligadores frente a otros ligadores, basándose en diferentes características y capacidades farmacológicas. Por ejemplo, se van a preferir los ligadores que contienen un enlace de disulfuro que está estéricamente “impedido”, debido a su mayor estabilidad, in vivo, previniendo de este modo la liberación del resto de toxina antes de la unión en el sitio de acción.

25

Se conoce una amplia variedad de agentes citotóxicos que se pueden conjugar con el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, incluyendo toxinas derivadas de plantas, hongos y bacterias, tal como cadena A de ricina o cadena A desglucosilada. La reticulación de una cadena de toxina A con un anticuerpo, en ciertos casos, requiere un reticulador que presente funciones de disulfuro. La razón para esto no es clara, pero es probablemente debido a la necesidad de algunos restos de toxina a ser liberables fácilmente del anticuerpo una vez que el agente haya “suministrado” la toxina a las células diana.

30

Cada tipo de reticulador, así como el cómo se realiza la reticulación, tenderá a variar la farmacodinamia del conjugado resultante. Finalmente, en casos donde está contemplada una toxina liberable, se desea tener un conjugado que permanecerá intacto en las condiciones encontradas en todo el cuerpo excepto en el sitio propuesto de acción, punto en el cual se desea que el conjugado tenga buenas características de “liberación”. Por lo tanto, el esquema particular de reticulación, incluyendo en particular el agente reticulador particular usado y las estructuras que se reticulan, serán de alguna importancia.

35

Dependiendo del compuesto de toxina específico usado como parte de la proteína de fusión, puede ser necesario proporcionar un espaciador peptídico que une operativamente el anticuerpo y el compuesto de toxina que es capaz de plegarse en una estructura de bucle unida por disulfuro. La escisión proteolítica dentro del bucle producirá entonces un polipéptido heterodímero en donde el anticuerpo y el compuesto de toxina se unen sólo por un enlace individual de disulfuro. Un ejemplo de esta toxina es una toxina de cadena A de ricina.

40

Cuando se usan algunos otros compuestos de toxina, se puede proporcionar un espaciador peptídico no escindible para unir operativamente el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 y el compuesto de toxina de la proteína de fusión. Las toxinas que se pueden usar junto con los espaciadores peptídicos no escindibles son las que se pueden convertir, por sí mismas, por escisión proteolítica, en una forma citotóxica unida por disulfuro. Un ejemplo de dicho compuesto de toxina es un compuesto de exotoxina de *Pseudomonas*.

45

Puede haber circunstancias, tal como cuando el antígeno diana no se internaliza por una ruta de acuerdo con la

intoxicación eficaz por inmunotoxinas, donde se deseará dirigirse a agentes quimioterapéuticos tales como agentes antitumorales, otras citoquinas, antimetabolitos, agentes de alquilación, hormonas, y similares. Ahora se ha conjugado satisfactoriamente una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros farmacológicos con los anticuerpos y han mostrado que funcionan de manera farmacológica. Los agentes antineoplásicos de ejemplo que se han investigado incluyen doxorubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, y varios otros. Además, se ha descrito la unión de otros agentes tales como neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α -amanitina.

Cuando se usan factores de coagulación en relación con la presente invención, cualquier enlace covalente con el anticuerpo se debe hacer en un sitio distinto de su sitio de coagulación funcional. Las composiciones por lo tanto se "unen" de cualquier manera operativa que permita que cada región realice su función prevista sin deterioro significativo. Por lo tanto, el anticuerpo se une al VEGF, y el factor de coagulación promueve la coagulación sanguínea.

C10. Reticuladores bioquímicos

Además de la información general proporcionada anteriormente, se pueden conjugar anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, con uno o más agentes terapéuticos usando algunos reticuladores bioquímicos preferidos. Se usan reactivos reticuladores para formar puentes moleculares que unen entre sí grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para unir dos proteínas diferentes de una manera gradual, se pueden usar reticuladores hetero-bifuncionales que eliminan la formación homopolimérica indeseada. Los reticuladores hetero-bifuncionales de ejemplo se citan en la tabla B.

Tabla B

Reticuladores hetero-bifuncionales			
Ligador	Reactivo contra	Ventajas y aplicaciones	Longitud del brazo espaciador después de reticulación
SMPT	Aminas primarias Sulfhidrilos	Mayor estabilidad	11,2 A
SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	Reticulación escindible por tiolación	6,8 A
LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido	15,6 A
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido soluble en agua	15,6 A
SMCC	Aminas primarias Sulfhidrilos	Grupo reactivo con maleimida estable Conjugación de enzima-anticuerpo Conjugación de hapteno-proteína portadora	11,6 A
Sulfo-SMCC	Aminas primarias Sulfhidrilos	Grupo reactivo con maleimida estable Soluble en agua Conjugación de enzima-anticuerpo	11,6 A
MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	Conjugación de enzima-anticuerpo Conjugación de hapteno-proteína portadora	9,9 A
Sulfo-MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	Soluble en agua	9,9 A
SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Conjugación de enzima-anticuerpo	10,6 A
Sulfo-SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Soluble en agua	10,6 A
SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido Conjugación de enzima-anticuerpo	14,5 A
Sulfo-SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador extendido Soluble en agua	14,5 A
EDC/Sulfo-NHS	Aminas primarias Grupos carboxilo	Conjugación hapteno-portador	0
ABH	Carbohidratos No selectivo	Reacciona con grupos azúcar	11,9 A

Los reticuladores hetero-bifuncionales contienen dos grupos reactivos: uno que reacciona en general con grupo amina primaria (p. ej., N-hidroxi-succinimida) y el otro que reacciona en general con un grupo tiol (p. ej., disulfuro de piridilo, maleimidas, halógenos, etc.). A través del grupo reactivo con amina primaria, el reticulador puede reaccionar con el o los restos lisina de una proteína (p. ej., el anticuerpo o fragmento seleccionado) y a través del grupo reactivo con tiol, el reticulador, ya unido a la primera proteína, reacciona con el resto cisteína (grupo sulfhidrilo libre) de la otra proteína (p. ej., el coagulante).

Por lo tanto, las composiciones tienen en general, o se derivatizan para tener, un grupo funcional disponible para propósitos de reticulación. Este requisito no se considera que sea limitante en cuanto que se puede usar una amplia variedad de grupos de esta manera. Por ejemplo, se pueden usar grupos amina primaria o secundaria, grupos hidracina o hidracina, alcohol carboxílico, fosfato, o grupos de alquilación para la unión o reticulación.

El brazo espaciador entre los dos grupos reactivos de un reticulador puede tener diferentes longitudes y composiciones químicas. Un brazo espaciador más largo permite una mayor flexibilidad de los componentes conjugados, mientras que algunos componentes particulares en el puente (p. ej., grupo benceno) pueden dar estabilidad adicional al grupo reactivo o una mayor resistencia del enlace químico a la acción de varios aspectos (p. ej., enlace disulfuro resistente a agentes reductores). También se contempla el uso de espaciadores peptídicos, tales como L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala.

Se prefiere usar un reticulador que tenga estabilidad razonable en la sangre. Se conoce numerosos tipos de ligadores que contienen enlaces de disulfuro que se pueden usar satisfactoriamente para conjugar anticuerpos y agentes tóxicos o coagulantes. Los ligadores que contienen un enlace de disulfuro que está estéricamente impedido pueden demostrar dar mayor estabilidad in vivo, previniendo la liberación del agente antes de la unión en el sitio de acción. Por lo tanto, estos ligadores son un grupo preferido de agentes de unión.

Uno de los reactivos reticuladores más preferidos para usar en inmunotoxinas es el SMPT, que es un reticulador bifuncional que contiene un enlace de disulfuro que está "estéricamente impedido" por un anillo de benceno adyacente y grupos metilo. Se cree que el impedimento estérico del enlace de disulfuro sirve como una función para proteger el enlace del ataque por aniones de tiolato tales como glutatión, que se puede estar presentes en tejidos y sangre, y ayudando así a prevenir el desacoplamiento del conjugado antes del suministro del agente unido al sitio de tumor. Está contemplado que el agente SMPT también se pueda usar en relación con los ligandos biespecíficos de esta invención.

El agente reticulador SMPT, como con muchos otros reactivos reticuladores conocidos, da la capacidad de reticular grupos funcionales tales como el SH de cisteína o aminas primarias (p. ej., el grupo amino épsilon de lisina). Otro posible tipo de reticulador incluye las fenilazidas fotorreactivas hetero-bifuncionales que contienen un enlace disulfuro escindible tales como sulfosuccinimidil- 2-(p-azido-salicilamido)-etil-1,3'-ditiopropionato. El grupo N-hidroxi-succinimidilo reacciona con grupos amino primarios y la fenilazida (tras la fotólisis) reacciona de manera no selectiva con cualquier resto de aminoácido.

Además de los reticuladores impedidos, también se pueden usar reticuladores no impedidos, de acuerdo con el presente documento. Otros reticuladores útiles, no considerados que contengan o generen un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano. El uso de estos reticuladores está bien entendido en la técnica.

Una vez conjugado, el conjugado se separa de los agentes terapéuticos y dirigidos no conjugados, y de otros contaminantes. Está disponible un gran número de técnicas de purificación para usar en la provisión de conjugados de un grado suficiente de pureza para volverlos clínicamente útiles. En general serán de mayor uso los procedimientos de purificación basados en separación por tamaño, tales como filtración en gel, permeación en gel o cromatografía líquida de alto rendimiento. También se pueden usar otras técnicas cromatográficas, tales como separación por BlueSepharose.

C11. Ligadores biológicamente liberables

Aunque se prefiere que cualquier resto de la unión tenga estabilidad razonable en la sangre, para prevenir la liberación sustancial del agente unido antes de dirigirse al sitio del tumor o enfermedad, en algunos aspectos, se contempla el uso de enlaces biológicamente liberables y/o espaciadores o ligadores selectivamente escindibles. Los "enlaces biológicamente liberables" y los "espaciadores o ligadores selectivamente escindibles" tendrán todavía estabilidad razonable en la circulación.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención se pueden, por lo tanto, unir a uno o más agentes terapéuticos mediante un enlace biológicamente liberable. Se puede usar cualquier forma de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, incluyendo anticuerpos intactos, aunque en algunas realizaciones se preferirán fragmentos ScFv.

5

Los "enlaces biológicamente liberables" o "enlaces selectivamente hidrolizables" incluyen todas las uniones que son liberables, escindibles o hidrolizables solamente o con preferencia en ciertas condiciones. Esto incluye enlaces disulfuro y trisulfuro y enlaces lábiles a ácido, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.474.765 y 5.762.918.

- 10 Está contemplado en particular el uso de un espaciador sensible a ácido para la unión de un agente terapéutico o fármaco a un anticuerpo de la invención. En dichas realizaciones, los agentes terapéuticos o fármacos se liberan dentro de los compartimientos ácidos dentro de una célula. Está contemplado que la liberación sensible a ácido pueda ocurrir de manera extracelular, pero todavía después del direccionamiento específico, preferiblemente al sitio tumoral. Algunos ejemplos actualmente preferidos incluyen anticuerpos humanos unidos a colchicina o doxorubicina
- 15 mediante un espaciador sensible a ácido. También está contemplada la unión mediante restos carbohidrato de los anticuerpos. En dichas realizaciones, los agentes o terapéuticos fármacos se liberan dentro de los compartimientos ácidos dentro de una célula.

- 20 El anticuerpo humano dirigido contra VEGF también se puede derivatizar para introducir grupos funcionales que permitan la unión del o de los agentes terapéuticos a través de un enlace biológicamente liberable. Por lo tanto, el anticuerpo humano se puede derivatizar para introducir cadenas laterales que terminan en grupos hidrazida, hidracina, amina primaria o amina secundaria. Los agentes terapéuticos se pueden conjugar a través de un enlace de base de Schiff, un enlace de hidrazona o acil-hidrazona o un ligador hidrazida (patentes de EE.UU. nº 5.474.765 y 5.762.918).

25

También, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.474.765 y 5.762.918, el anticuerpo humano dirigido contra VEGF se puede unir operativamente al o a los agentes terapéuticos a través de uno o más enlaces biológicamente liberables que son enlaces sensibles a enzimas, incluyendo enlaces peptídicos, ésteres, amidas, fosfodiésteres y glicósidos.

30

Los aspectos preferidos de la invención se refieren al uso de ligadores peptídicos que incluyen al menos un primer sitio de escisión para una peptidasa y/o proteinasa que se localiza preferentemente dentro de un sitio de enfermedad, en particular dentro del entorno tumoral. El suministro mediado por anticuerpo del agente terapéutico unido por lo tanto da como resultado la escisión específicamente dentro del sitio de enfermedad o entorno tumoral,

35 lo que da la liberación específica del agente activo. Algunos ligadores peptídicos incluirán un sitio de escisión que es reconocido por una o más enzimas comprendidas en el remodelado.

- Los ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para uroquinasa, pro-uroquinasa, plasmina, plasminógeno, TGF β , estafiloquinasa, trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteínasa, tales como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, son particularmente preferidos. Se hace referencia a las patentes de EE.UU. nº 6.004.555, 5.877.289 y 6.093.399, con el propósito de describir adicionalmente y permitir cómo hacer y usar construcciones de agente de direccionamiento-agente terapéutico que comprenden enlaces biológicamente liberables y ligadores y péptidos selectivamente escindibles. Se hace referencia a las patentes de EE.UU. nº 5.877.289 y 6.342.221, en particular, con el propósito de describir más y permitir cómo hacer y usar construcciones
- 40 de anticuerpo que comprenden un ligador peptídico selectivamente escindible que es escindido por uroquinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteínasa, tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, dentro de un entorno tumoral.

- Los ligadores peptídicos selectivamente escindibles actualmente preferidos son los que incluyen un sitio de escisión para plasmina o una metaloproteínasa (también conocidas como "metaloproteasas de matriz" o "MMP"), tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina. Los ligadores peptídicos adicionales que se pueden usar de manera ventajosa en relación con la presente invención incluyen, por ejemplo, las secuencias escindibles de pro-uroquinasa, TGF β , plasminógeno, estafiloquinasa, Gelatinasa A, varios colágenos, α_2 M, PZP, α_1 M, α_1 I₃(2J) y α_1 I₃(27J), incluyendo las secuencias particulares descritas y reivindicadas en la patente de EE.UU. nº 6.342.221.

55

C12. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son particularmente útiles en el coaguligando y aspectos antiangiogénicos combinados de la presente invención. Sin embargo, en general se pueden usar anticuerpos biespecíficos, siempre

que un brazo se una al VEGF, y el anticuerpo biespecífico se una a un agente terapéutico, en general en un sitio distinto del sitio de unión al antígeno.

En general, también se conoce en la técnica la preparación de anticuerpos biespecíficos. Un procedimiento implica la preparación separada de anticuerpos que tienen especificidad por el antígeno diana, por una parte, y (como en el presente documento) un agente de coagulación en el otro. Se preparan fragmentos $F(ab'y)_2$ pépticos a partir de los dos anticuerpos elegidos, seguido de reducción de cada uno para proporcionar fragmentos $Fab'y_{SH}$ separados. Los grupos SH en uno de los dos miembros de la pareja que se van a acoplar se alquilan después con un reactivo de alquilación tal como o-fenilendimaleimida para proporcionar grupos maleimida libres en un miembro de la pareja. Este miembro de la pareja entonces se puede conjugar con otro por medio de un enlace tioéter, para dar el heteroconjugado $F(ab'y)_2$ deseado. Se conocen otras técnicas en las que se lleva a cabo la reticulación con SPDP o proteína A, o se prepara una construcción trispecífica.

D. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenderán en general una cantidad eficaz de al menos un primer anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, disuelto o dispersado en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. También están contemplados los productos terapéuticos combinados, y se puede usar el mismo tipo de composición farmacéutica subyacente tanto para los medicamentos individuales como combinados.

Las frases "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica o de otro modo indeseada, cuando se administran a un animal, o un ser humano, según sea adecuado. Los usos veterinarios se incluyen igualmente dentro de la invención y las formulaciones "farmacéuticamente aceptables" incluyen formulaciones tanto para uso clínico como/o veterinario.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, está contemplado su uso en las composiciones terapéuticas. Para administración humana, las preparaciones deben cumplir con las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como requiere la Oficina de estándares biológicos de la FDA. En las composiciones también se pueden incorporar principios activos complementarios.

Las formulaciones de "dosis unitaria" son las que contienen una dosis o sub-dosis del ingrediente administrado adaptada para una administración programada, particular. Por ejemplo, las formulaciones de "dosis unitaria" de ejemplo son las que contienen una dosis o unidad diaria o subdosis diaria o una dosis o unidad semanal o una subdosis semanal y similares.

D1. Formulaciones inyectables

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, o inmunoconjugados, de la presente invención, se formularán más frecuentemente para administración parenteral, p. ej., formulados para inyección por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica u otras de dichas vías, incluyendo administración peristáltica e instilación directa en un sitio de tumor o enfermedad (administración de intracavidad). La preparación de una composición acuosa que contenga dicho anticuerpo o inmunoconjugado como un principio activo la conocerán los expertos en la materia en vista de la presente descripción. Típicamente, dichas composiciones se pueden preparar como productos inyectables, sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para usar para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y también se pueden emulsionar las preparaciones.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuate o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida en la medida en que exista capacidad de uso en jeringa. Debe ser estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento y se debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las composiciones de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, se pueden formular en una composición acuosa estéril en una forma neutra o de sal. Se pueden preparar soluciones como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libre de la proteína), y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, trifluoroacético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. También se pueden derivar sales formadas con grupos carboxilo libres, a partir de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Los vehículos adecuados incluyen disolventes y medios de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de dispersión y/o por el uso de agentes tensioactivos.

En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, todas dichas preparaciones deben contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede hacer mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede hacer mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Antes de o tras la formulación, el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, se debe dializar de manera extensa para eliminar moléculas indeseadas de pequeño peso molecular, y/o liofilizar para la formulación más fácil en un vehículo deseado, según sea adecuado. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los agentes activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se desee, seguido de esterilización filtrada. En general, se preparan dispersiones incorporando los diferentes principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente.

En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del principio activo, más cualquier principio activo adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas de acuerdo con la invención incluirán en general una cantidad del anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, mezclado con un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución acuosa estéril, para dar un intervalo de concentraciones finales, dependiendo del uso previsto. Las técnicas de preparación se conocen en general bien en la técnica como se ilustra por *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª Ed. Mack Publishing Company, 1980. Se debe apreciar que la contaminación de endotoxinas se debe mantener de manera mínima a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0.5 ng/mg de proteína. Además, para administración humana, las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiera la Oficina de estándares biológicos de la FDA. Tras la formulación, las soluciones de anticuerpo o de inmunoconjugado se administrarán de una manera compatible con la forma farmacéutica y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz.

50 D2. Formulaciones de liberación sostenida

Las formulaciones de soluciones de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, o inmunoconjugados, se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descrito anteriormente, pero también se contemplan otras formas farmacéuticamente aceptables, p. ej., comprimidos, píldoras, cápsulas u otros sólidos para administración oral, supositorios, pesarios, soluciones o pulverizadores nasales, aerosoles, inhalantes, formulaciones tópicas, formas liposomales y similares. El tipo de forma para la administración se hará corresponder con la enfermedad o trastorno que se va a tratar.

Se pueden usar, y en general son aplicables, las cápsulas farmacéuticas de "liberación lenta" o las composiciones o

preparaciones de “liberación sostenida”. En general, las formulaciones de liberación lenta se diseñan para dar un nivel de fármaco constante durante un periodo prolongado y se pueden usar para suministrar un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención. Las formulaciones de liberación lenta se implantan típicamente en la proximidad del sitio de enfermedad, por ejemplo, en el sitio de un tumor.

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado, cuyas matrices están en la forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres; hidrogeles, por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietil) o poli(alcohol vinílico); polilactidas; p. ej., patente de EE.UU. n° 3.773.919; copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato; etileno-acetato de vinilo no degradable; copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como Lupron DepotTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida); y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando permanecen en el cuerpo anticuerpos encapsulados durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a la humedad a 37°C, reduciendo así la actividad biológica y/o cambiando la inmunogenicidad. Están disponibles estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación comprende la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, se logra la estabilización al modificar los restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones acidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica, y similares.

D3. Liposomas y nanopartículas

En algunas realizaciones, también se pueden usar liposomas y/o nanopartículas con los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 o inmunoconjugados. La formación y uso de liposomas en general es conocida por los expertos en la materia, como se resume más adelante.

Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman de manera espontánea vesículas de bicapa, concéntricas, multilaminares (también llamadas vesículas multilaminares (MLV). Las MLV tienen en general diámetros desde 25 nm a 4 μ m. El tratamiento con ultrasonido de las MLV da como resultado la formación de vesículas unilaminares más pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras diferentes de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar de lípido a agua. En relaciones bajas, el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, concentración iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas sufren una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase comprende un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocida como el estado de gel, a una estructura menos ordenada, empaquetada de manera floja, conocida como el estado fluido. Esto ocurre a una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un aumento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interaccionan con células mediante cuatro mecanismos diferentes: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, sea por fuerzas hidrófobas o electrostáticas, débiles, no específicas, o por interacciones específicas de los componentes de superficie celular; fusión con la membrana celular plasmática por inserción de la bicapa lipídica de liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares, o subcelulares o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos del liposoma. La variación de la formulación del liposoma puede alterar que mecanismo es operativo, aunque puede operar más de uno al mismo tiempo.

En general las nanocápsulas pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de alrededor de 0,1 μ m) se deben diseñar usando polímeros capaces de ser degradados in vivo. Las nanopartículas de

poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables que cumplen con estos requisitos están contempladas para usar en la presente invención, y dichas partículas se pueden producir fácilmente.

D4. Formulaciones oftálmicas

5

Muchas enfermedades con un componente angiogénico se asocian con el ojo. Por ejemplo, las enfermedades asociadas con neovascularización corneal que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, desgaste por lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis sicca de pterigión, enfermedad de sjogrens, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, traumatismo, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, sarcoidosis de Wegeners, escleritis, enfermedad de Steven Johnson, queratotomía radial, penfigoide, y rechazo de injerto corneal.

Las enfermedades asociadas con neovascularización de la retina/coroidea que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástica, enfermedad de Pagets, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechets, infecciones que provocan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Bests, miopía, fosetas papilares, enfermedad de Stargarts, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones post-láser.

25

Otras enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades provocadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa, ya sea asociada o no con diabetes.

30

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 e immunoconjugados de la presente invención se pueden usar por lo tanto de manera ventajosa en la preparación de composiciones farmacéuticas adecuadas para usar como soluciones oftálmicas incluyendo aquellas para administración intravítrea y/o intracámara, ya sea como un agente individual o en combinación con otros fármacos o agentes oculares. Para el tratamiento de cualquiera de los trastornos anteriores u otros, se administrará una composición de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 de la invención, en el ojo u ojos del sujeto que necesite tratamiento en la forma de una preparación oftálmica preparada de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, véase, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1488 a 1501 (Mack Publishing Co., Easton, PA).

40

La preparación oftálmica contendrá al menos un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 % en una solución, suspensión o pomada farmacéuticamente aceptable. Se presentará necesariamente alguna variación en la concentración, dependiendo del compuesto particular usado, de la afección del sujeto que se va a tratar y similares, y la persona responsable del tratamiento determinará la concentración más adecuadas para el sujeto individual. La preparación oftálmica estará preferiblemente en la forma de una solución acuosa estéril que contiene, si se desea, ingredientes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes de aumento de la viscosidad y similares.

50

Los conservantes adecuados para usar en dicha solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y preferiblemente entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Los agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de modo que el equivalente de cloruro de sodio de la solución oftálmica está en el intervalo de 0,9 más o menos 0,2 %.

55

Los antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio,

tiourea y similares. Los agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes de aumento de la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, petrolato, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares. La preparación oftálmica se administrará por vía tópica al ojo del sujeto que necesite tratamiento por procedimientos convencionales, por ejemplo en la forma de gotas o por baño del ojo en la solución oftálmica.

D5. Formulaciones tópicas

- 10 En el sentido más amplio, las formulaciones para administración tópica incluyen aquellas para suministrar por la boca (bucal) y a través de la piel. Los “sistemas de suministro tópico” también incluyen parches transdérmicos que contienen el ingrediente que se va a administrar. El suministro a través de la piel se puede lograr además por iontoforesis o electrotransporte, si se desea.
- 15 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden los ingredientes en una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y lavados bucales que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un vehículo líquido adecuado.
- 20 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la piel incluyen pomadas, cremas, geles y pastas que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un vehículo farmacéutico aceptable. La formulación de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 para uso tópico, tal como en crema, pomadas y geles, incluye la preparación de bases de pomada oleaginosas o solubles en agua, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estas composiciones pueden incluir aceites vegetales, grasas animales, y lo
- 25 más preferiblemente, hidrocarburos semisólidos obtenidos de petróleo. Los componentes particulares usados pueden incluir pomada blanca, pomada amarilla, cera de ésteres de cetilo, ácido oleico, aceite de oliva, parafina, vaselina, vaselina blanca, espermaceti, almidón-glicerita, cera blanca, cera amarilla, lanolina, lanolina anhidra y monoestearato de glicerilo. También se pueden usar varias bases de pomada solubles en agua, que incluyen éteres glicólicos y derivados, polietilenglicoles, estearato de polioxilo 40 y polisorbatos.
- 30 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada, que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio activo vehículos tales como los que se conocen en la técnica que son adecuados.

D6. Formulaciones nasales

- Está contemplado el suministro local por las rutas nasal y respiratoria para tratar diferentes afecciones. Estas rutas de suministro también son adecuadas para suministrar agentes a la circulación sistémica. Las formulaciones de principios activos en los vehículos adecuados para administración nasal por lo tanto también se incluyen dentro de la invención, por ejemplo, soluciones nasales, pulverizadores, aerosoles e inhaladores. Cuando el vehículo es un sólido, las formulaciones incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros, que se administra, p. ej., por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un
- 45 recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz.
- Las formulaciones adecuadas en donde el vehículo es un líquido son útiles en administración nasal. Las soluciones nasales normalmente son soluciones acuosas diseñadas para ser administradas a los conductos nasales en gotas o pulverizadores y se preparan de modo que son similares en muchos aspectos a secreciones nasales, de modo que se mantiene la acción ciliar normal. Por lo tanto, las soluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5. Además, se pueden incluir en la formulación conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas, y estabilizantes de fármaco adecuados, si se requieren. Se conocen varias preparaciones nasales comerciales e incluyen, por ejemplo, antibióticos y antihistaminas y se usan para profilaxis asmática.
- 50 Las inhalaciones y los inhalantes son preparaciones farmacéuticas diseñadas para suministrar un fármaco o compuesto en el árbol respiratorio de un paciente. Se administra un vapor o neblina y alcanza el área afectada. Esta ruta también se puede usar para suministrar agentes en la circulación sistémica. Se pueden administrar inhalaciones por las rutas nasal u oral, respiratorias. La administración de soluciones de inhalación solo es eficaz si las gotas

pequeñas son suficientemente finas y de tamaño uniforme de modo que la neblina llegue a los bronquios.

Otro grupo de productos, también conocidos como inhalaciones y algunas veces llamados insuflaciones, comprenden fármacos líquidos o en polvo fino que son transportados a los conductos respiratorios mediante el uso de sistemas de suministro especiales, tales como aerosoles farmacéuticos, que mantienen una solución o suspensión del fármaco en un propulsor de gas licuado. Cuando se liberan a través de una válvula adecuada y adaptador oral, se impulsa una dosificación de la inhalación en el tracto respiratorio del paciente. El tamaño de partículas es de importancia principal en la administración de este tipo de preparación. Se ha descrito que el tamaño óptimo de partículas para penetración en la cavidad pulmonar es del orden de 0,5 a 7 μm . Se producen nieblas finas mediante aerosoles presurizados y por lo tanto se considera ventajoso su uso.

E. Kits terapéuticos

Esta invención también proporciona kits terapéuticos que comprenden un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, para usar en los presentes procedimientos de tratamiento. Estos kits contendrán en general, en un medio de recipiente adecuado, una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o inmunoconjugado. Los kits también pueden contener otras formulaciones farmacéuticamente aceptables, sea para diagnóstico/formación de imágenes o terapia combinada. Por ejemplo, dichos kits pueden contener uno o más de una variedad de fármacos quimioterapéuticos o radioterapéuticos; agentes antiangiogénicos; anticuerpos anticélulas tumorales; y/o inmunotoxinas dirigidas contra la vasculatura tumoral o contra el estroma tumoral, o coaguligandos.

Los kits pueden tener un recipiente individual (medio recipiente) que contiene el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o inmunoconjugado, con o sin algún componente adicional, o pueden tener recipientes distintos para cada agente deseado. Cuando se proporcionan productos terapéuticos combinados, se puede premezclar en una solución individual, ya sea en una combinación equivalente molar, o con un componente en exceso del otro. Alternativamente, cada uno del anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o inmunoconjugado y otros componentes de antineoplásicos del kit, se pueden mantener de manera separada dentro de recipientes distintos antes de la administración a un paciente.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida es preferiblemente una solución acuosa, siendo particularmente preferida una solución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo o polvos secos. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir por la adición de un disolvente adecuado. Está contemplado que el disolvente también se puede proporcionar en otro recipiente.

Los recipientes del kit incluirán en general al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio recipiente, en el cual se puede colocar el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, y cualquier otro agente deseado, y preferiblemente, adecuadamente en partes alícuotas. Cuando se incluyen componentes separados, el kit también contendrá en general un segundo vial u otro recipiente en el cual se coloquen estos, permitiendo la administración de dosis designadas, separadas. Los kits también pueden comprender un segundo/tercer medio recipiente para contener un tampón estéril, farmacéuticamente aceptable, u otro diluyente.

Los kits pueden contener también un medio por el cual administrar el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o inmunoconjugado a un animal o paciente, p. ej., una o más agujas o jeringas, o incluso un gotero para ojos, pipeta, u otro aparato similar, del cual se puede inyectar la formulación en el animal o aplicar a un área enferma del cuerpo. Los kits de la presente invención también incluirán de manera típica un medio para contener los viales, o similares, y el otro componente, en un confinamiento cerrado para venta comercial, tal como por ejemplo, recipientes plásticos moldeados por soplado o por inyección en los cuales se colocan y retienen los viales y otros aparatos.

F. Terapia antiangiogénica

La presente invención se puede usar para tratar animales y pacientes con angiogénesis aberrante, de modo que contribuye a una variedad de enfermedades y trastornos, sola o en terapias de combinación. Los más prevalentes y/o clínicamente importantes de estos, fuera del campo del tratamiento de cáncer incluyen artritis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Grave, reestenosis vascular, incluyendo reestenosis después de angioplastia, malformaciones arteriovenosas (AVM),

meningioma, hemangioma y glaucoma neovascular. Otras dianas potenciales para intervención incluyen angiofibroma, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto corneal, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osler-Weber, fibroplasia retrolental de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, varias enfermedades y trastornos inflamatorios diferentes, e incluso endometriosis. Las enfermedades y trastornos adicionales que se pueden tratar por la invención, y las bases que unifican estos trastornos angiogénicos, se exponen a continuación.

Una enfermedad en la cual está implicada la angiogénesis es la artritis reumatoide, en donde los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies de oxígeno reactivo que conducen al crecimiento de pannus y destrucción de cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir de manera activa a, y ayudar a mantener, el estado crónicamente inflamado de la artritis reumatoide. Los factores asociados con la angiogénesis tienen también un papel en la osteoartritis, que contribuye a la destrucción de la articulación.

Harada y col. (1998) mostró que el VEGF está implicado en la patogénesis de la artritis reumatoide, y además, que la medición de la concentración en el suero del VEGF es un procedimiento útil no invasivo para el seguimiento de la actividad de la enfermedad de artritis reumatoide. Esto respalda los usos terapéuticos y de diagnóstico de la presente invención en relación con la artritis reumatoide.

Nagashima y col. (1999) describieron los efectos inhibidores de fármacos antirreumáticos en el VEGF en células sinoviales reumatoides cultivadas. El VEGF es expresado constitutivamente en el sinovio de la artritis reumatoide. Se mostró que el fármaco antirreumático conocido, bucilamina (BUC), incluye dentro de su mecanismo de acción la inhibición de la producción de VEGF por células sinoviales. Por lo tanto, los efectos antirreumáticos de BUC son mediados por supresión de angiogénesis y proliferación sinovial en el sinovio artrítico a través de la inhibición de la producción de VEGF por células sinoviales. El uso de la presente invención como una terapia antiartrítica es respaldada por las acciones inhibidoras de VEGF de este producto terapéutico existente.

Otro ejemplo de una enfermedad mediada por angiogénesis es la enfermedad neovascular ocular. Esta enfermedad se caracteriza por invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo, tales como la retina o córnea. Es la causa más común de ceguera y está implicada en aproximadamente veinte enfermedades oculares. En la degeneración macular asociada a la edad, los problemas visuales asociados son producidos por un crecimiento hacia adentro de capilares coroidales a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular por debajo del epitelio de pigmento de la retina. También se asocia daño angiogénico con retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental.

Otras enfermedades asociadas con neovascularización corneal incluyen, pero no se limitan a queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, desgaste por lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca de pterigión, enfermedad de sjogrens, acné rosácea, fillectenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración de lípidos, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismo, sarcoidosis de Wegeners, escleritis, enfermedad de Steven Johnson, queratotomy radial, penfigoide, y rechazo de injerto corneal.

Las enfermedades asociadas con neovascularización de la retina/coroidea incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, incluyendo degeneración macular asociada a la edad (AMD), anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástica, enfermedad de Pagets, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechets, infecciones que provocan retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Bests, miopía, fosetas papilares, enfermedad de Stargarts, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones de postlaser.

Con respecto a la neovascularización coroidea, tal como la asociada con la degeneración macular, AMD y otras enfermedades oculares, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención son en particular bien adecuados para usar en el tratamiento. Esto es, en parte, debido a que bloquean sustancialmente la unión del VEGF al VEGFR2 sin bloquear sustancialmente la unión del VEGF al VEGFR1 y los beneficios resultantes en el ojo (Nozaki y col, 2006), que resalta otra ventaja de la presente invención con respecto a los tratamientos existentes dirigido contra VEGF, tal como, p. ej., Avastin y el producto relacionado Lucentis®.

Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) enfermedades provocadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa.

5

La inflamación crónica también implica angiogénesis patológica. Los estados patológicos tal como la colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn muestran cambios histológicos con el crecimiento hacia adentro de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos inflamados. La bartonelosis, una infección bacteriana encontrada en Sudamérica, puede dar como resultado una fase crónica que se caracteriza por proliferación de células endoteliales vasculares.

10

Otra función patológica asociada con la angiogénesis se encuentra en la aterosclerosis. Se ha mostrado que las placas formadas dentro de la luz de los vasos sanguíneos tienen actividad estimuladora angiogénica. La expresión del VEGF en lesiones ateroscleróticas coronarias humanas se demostró por Inoue y col. (1998). Esto pone de manifiesto la importancia fisiopatológica del VEGF en el progreso de la aterosclerosis coronaria humana, así como en procesos de recanalización en enfermedades coronarias obstructivas. La presente invención proporciona un tratamiento eficaz para estas afecciones.

15

Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes de la infancia es el hemangioma. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos y remiten sin intervención. En casos más graves, los tumores progresan a formas cavernosas e infiltrantes grandes y crean complicaciones clínicas. Las formas sistémicas de los hemangiomas, la hemangiomatosis, tienen una alta tasa de mortalidad. Existen hemangiomas resistentes a terapia que no se pueden tratar con los productos terapéuticos actualmente en uso.

20

La angiogénesis también es responsable del daño encontrado en enfermedades hereditarias tales como enfermedad de Osler-Weber-Rendu, o telangiectasia hemorrágica hereditaria. Estas es una enfermedad heredada, caracterizada por múltiples angiomas pequeños, tumores de vasos sanguíneos o linfoides. Los angiomas se encuentran en la piel y membranas mucosas, acompañados con frecuencia de epistaxis (hemorragias nasales) o hemorragia gastrointestinal y algunas veces con fístula arteriovenosa hepática o pulmonar.

25

La angiogénesis también está implicada en procesos fisiológicos normales tal como la reproducción y curación de heridas. La angiogénesis es una etapa importante en la ovulación y también en la implantación de la blástula después de la fertilización. La prevención de la angiogénesis se podría usar para inducir amenorrea, para bloquear la ovulación o para impedir la implantación por la blástula.

30

En la curación de heridas, una reparación excesiva o fibroplasia puede ser un efecto secundario perjudicial de los procedimientos quirúrgicos y se puede provocar o exacerbar por la angiogénesis. Las adherencias son una complicación frecuente de la cirugía y conducen a problemas tales como obstrucción del intestino delgado.

35

Las enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable también se pueden tratar mediante la presente invención. Estas incluyen edema asociado con tumores cerebrales, ascitis asociada con tumores malignos, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericardiaca, y efusión pleural, como se describe en el documento WO 98/16551.

40

Cada una de las enfermedades y trastornos anteriores, junto con todo los tipos de tumores, como se describe en las siguientes secciones, se pueden tratar de manera eficaz mediante la presente invención de acuerdo con el conocimiento en la técnica, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. n° 5.712.291, que unifica los beneficios que resultan de la aplicación de estrategias antiangiogénicas con el tratamiento de enfermedades angiogénicas. Además, se hace referencia a la patente de EE.UU. n° 6.524.583 con el propósito de incluir la descripción adicional y permitir el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos usando un anticuerpo dirigido contra VEGF.

50

Los anticuerpos humanos y/o inmunoconjugados de la invención se usan lo más preferiblemente en el tratamiento de tumores. Los tumores en los cuales la angiogénesis es importante incluyen tumores malignos, y tumores benignos, tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piogénicos. La angiogénesis es en particular notable en formación de tumores sólidos y metástasis. Sin embargo, la angiogénesis también se asocia con tumores transmitidos por la sangre, tales como leucemias, y varias enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea donde se produce proliferación no restringida de leucocitos sanguíneos, normalmente acompañada de anemia, coagulación sanguínea deteriorada y agrandamiento de los ganglios linfáticos, hígado, y bazo. La angiogénesis también tiene una función en las anomalías en la médula ósea que dan lugar a tumores tipo

55

leucemia.

La angiogénesis es importante en dos etapas de la metástasis tumoral. En la vascularización del tumor primario, la angiogénesis permite que las células entren a la corriente sanguínea y circulen por todo el cuerpo. Después de que las células tumorales han dejado el sitio primario, y se han asentado en el sitio secundario de metástasis, puede presentarse la angiogénesis antes de que el nuevo tumor pueda crecer y extenderse. Por lo tanto, la prevención de la angiogénesis puede prevenir la metástasis de tumores y contener el crecimiento neoplásico en el sitio primario, permitiendo el tratamiento por otros productos terapéuticos, en particular construcciones de agentes terapéutico-agente de direccionamiento (véase posteriormente).

Los procedimientos de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, o inmunoconjugado, proporcionados por esta invención, por lo tanto se pueden aplicar ampliamente al tratamiento de cualquier tumor maligno que tenga un componente vascular. Cuando se usan los anticuerpos y/o inmunoconjugados de la invención en el tratamiento de tumores, en particular tumores malignos vascularizados, los agentes se pueden usar solos o en combinación con, p. ej., agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos, apoptóticos, antiangiogénicos y/o inmunotoxinas o coagulandos.

Los tumores vascularizados típicos para el tratamiento son los tumores sólidos, en particular carcinomas que requieren un componente vascular para proporcionar oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos de ejemplo que se pueden tratar usando la invención incluyen, pero no se limita a, carcinomas del pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, y similares. También se hace referencia al documento WO 98/45331 en el presente documento para ilustrar más la variedad de tipos de tumor que se pueden tratar de manera eficaz usando un anticuerpo dirigido contra VEGF.

El conocimiento de la función de la angiogénesis en el mantenimiento y metástasis de tumores ha conducido a un indicador de pronóstico para cánceres tales como el cáncer de mama. La cantidad de neovascularización encontrada en el tumor primario se determinó contando la densidad de microvasos en el área de neovascularización más intensa en el carcinoma invasivo de mama. Se encontró un alto nivel de densidad de microvasos que se correlacionan con la recurrencia del tumor. El control de la angiogénesis por las terapias de la presente invención reducirá o anulará la recurrencia de dichos tumores.

La presente invención se contempla para usar en el tratamiento de cualquier paciente que presente un tumor sólido. En vista de las propiedades específicas de las composiciones de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueante de VEGFR2, los productos terapéuticos de la presente invención tendrán efectos secundarios reducidos. Las ventajas particulares darán como resultado el mantenimiento o mejora de las respuestas inmunitarias del hospedante contra el tumor, y la carencia de efectos adversos en el tejido óseo. La invención de esta manea será la terapia antiangiogénica de elección para el tratamiento de cánceres pediátricos y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, osteoporosis, y otras deficiencias óseas.

Aunque se pueden tratar mediante la invención todos los tumores malignos y tumores sólidos, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, no conjugados, de esta invención, están contemplados en particular para usar en el tratamiento de pacientes con tumores más angiogénicos, o pacientes en riesgo de metástasis.

La presente invención también está dirigida a un tratamiento preventivo o profiláctico. Estos aspectos de la invención incluyen la capacidad de la invención para tratar pacientes que presentan un tumor primario que pueden tener tumores metastáticos, o células tumorales en las etapas tempranas de la siembra de tumores metastáticos. Como una estrategia antiangiogénica, la presente invención también se puede usar para impedir el desarrollo tumoral en sujetos con riesgo moderado o alto de desarrollar un tumor, basado en pruebas de pronóstico y/o parientes cercanos que padecen de un cáncer hereditario.

Las formas conjugadas o de inmunotoxina de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF o bloqueantes de VEGFR2 de la invención, están contemplados en particular para usar en la destrucción o reducción de tumores sólidos. Estos aspectos de la invención se pueden usar junto con los anticuerpos antiangiogénicos no conjugados de la invención, o con otros procedimientos antiangiogénicos.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que el inmunoconjugado y las formas de profármaco de los

presentes procedimientos de tratamiento tienen la ventaja distinta de proporcionar un agente terapéutico único con dos propiedades: la propiedad antiangiogénica inherente del anticuerpo y la propiedad terapéutica del agente unido (p. ej., citotóxico, coagulante, apoptótico, etc.). Las formas de tratamiento de profármaco y conjugado de los presentes anticuerpos tiene por lo tanto una utilidad increíblemente amplia en todo el campo del tratamiento del

La guía proporcionada en el presente documento con respecto a los pacientes más adecuados para usar en relación con los diferentes aspectos de la presente invención se propone como enseñanza de que determinados perfiles de pacientes pueden ayudar con la selección de pacientes para el tratamiento mediante la presente invención. La preselección de determinados pacientes, o categorías de pacientes, de ninguna manera anula la utilidad de la presente invención en relación con el tratamiento de todos los pacientes que tienen un tumor vascularizado, u otra enfermedad angiogénica como se ha descrito anteriormente. Una consideración adicional es el hecho que la agresión en el tumor proporcionado por la invención puede predisponer al tumor a tratamiento terapéutico adicional, de modo que el tratamiento subsiguiente dé como resultado un efecto sinérgico completo o incluso conduzca a una remisión o cura total.

No se cree que ningún tipo particular de tumor se deba excluir del tratamiento usando la presente invención. Sin embargo, el tipo de células tumorales puede ser relevante para el uso de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos, en particular agentes quimioterapéuticos e inmunotoxinas dirigidas contra células tumorales. Tanto los aspectos conjugados como no conjugados de las presentes terapias incluirán un efecto antiangiogénico que inhibirá la proliferación de la vasculatura tumoral. Los aspectos de tratamiento de profármaco y conjugado destruirá más u ocluirá la vasculatura tumoral. Puesto que la vasculatura es sustancial o completamente la misma en todos los tumores sólidos, se entenderá que la presente metodología es amplia o completamente aplicable al tratamiento de todos los tumores sólidos, independientemente del fenotipo o genotipo particular de las propias células tumorales.

Las dosis terapéuticamente eficaces de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, o construcciones de inmunoconjugado, se pueden determinar fácilmente usando datos de un modelo de animal, p. ej., como se muestra en los estudios detallados en el presente documento. Se usan frecuentemente animales experimentales que llevan tumores sólidos, para optimizar dosis terapéuticas adecuadas antes de trasladarla a un entorno clínico. Se sabe que dichos modelos son muy confiables en la predicción de estrategias antineoplásicas eficaces. Por ejemplo, se usan ampliamente en ensayos preclínicos ratones que llevan tumores sólidos, tales como los usados en los ejemplos. Los autores de la invención han usado dichos modelos de ratón aceptados en la técnica para determinar intervalos de trabajo de los agentes terapéuticos que dan efectos antitumorales beneficiosos con toxicidad mínima.

Cuando se usan los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 no conjugados, en terapias antiangiogénicas, también se pueden extraer otros datos publicados a fin de ayudar en la formulación de las dosis para el tratamiento clínico. Por ejemplo, aunque los anticuerpos de la presente invención tienen ventajas distintas respecto a los de la técnica, la información en la bibliografía con respecto al tratamiento con otros anticuerpos dirigidos contra VEGF todavía se puede usar en combinación con los datos y la enseñanza en la presente solicitud, para diseñar y/o optimizar protocolos y dosis de tratamiento.

Por ejemplo, Borgstrom y col. (1999), describieron la importancia del VEGF en la angiogénesis del cáncer de mama in vivo usando MAb A4.6.1. La forma humanizada del anticuerpos A4.6.1 (Avastin, bevacizumab) se ha aprobado para uso clínico (Hurwitz y col., 2004). Puesto que los anticuerpos humanos de esta invención presentaban respuestas antitumorales equivalentes o incluso mejoradas en estudios comparativos con A4.6.1/Avastin, estos anticuerpos también tendrán utilidad significativa en el tratamiento de cáncer en seres humanos, incluyendo cáncer de mama. Los autores de la invención se dieron cuenta además, como apreciarán los expertos en la materia, que los pacientes con cáncer de mama son típicamente mujeres en los grupos de edad intermedia o posterior, donde también son evidentes los problemas relacionados con la osteoporosis. Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención tendrán por lo tanto la ventaja adicional de no provocar un efecto adverso en el metabolismo óseo, y por lo tanto, se preferirán para usar en pacientes con cáncer de mama que tienen o están en riesgo de desarrollar osteoporosis.

El mismo tipo de beneficios hace a los productos terapéuticos de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2, los fármacos preferidos para el tratamiento de cánceres pediátricos. En los niños con cáncer, es evidente la necesidad de continuar el crecimiento óseo sano y sustancial. Puesto que los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 no deteriorarán de sustancialmente la actividad de los osteoclastos y los condroclastos, que son importantes en el desarrollo óseo, estos anticuerpos tendrán ventajas

importantes frente a otros anticuerpos, tal como Avastin.

Borgstrom y col. (1999), también describieron que MAb A4.6.1 daba como resultado remisión significativa de tumores cuando se usaba en combinación con doxorubicina. Esto respalda más el uso combinado de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 y agentes citotóxicos o quimioterapéuticos convencionales para lograr resultados clínicos significativos en el tratamiento de una variedad de cánceres. Están contempladas combinaciones de profármaco de doxorubicina no conjugada y doxorubicina.

Ferrara y colaboradores también describieron sobre la eficiencia y concentración-respuesta de un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra VEGF en ratones que llevaban tumor y la extrapolación al tratamiento humano (Mordenti y col., 1999). Los estudios se diseñaron para evaluar la relación o concentración-respuesta del anticuerpo monoclonal murino dirigido contra VEGF de modo que se podía estimar una concentración plasmática eficaz de la forma humanizada recombinante del anticuerpo en pacientes con cáncer. Mordenti y col. (1999) concluyeron que se logró la supresión tumoral satisfactoria en ratones sin pelo usando dosis del anticuerpo murino que se podían aplicar fácilmente al sistema humano con el fin de definir regímenes de dosificación clínicos eficaces para mantener un anticuerpo terapéutico para uso humano en el intervalo eficaz requerido. Por consiguiente, los datos de los presentes modelos de ratón aceptados en la técnica también se pueden trasladar a dosis humanas adecuadas usando el tipo de análisis reportado en Mordenti y col. (1999), además de las técnicas conocidas por el experto en la materia como se describe en el presente documento.

Los resultados de las evaluaciones preclínicas de seguridad de una forma humanizada, recombinante del anticuerpo dirigido contra VEGF de Genentech, en monos (Ryan y col., 1999) sirven para ilustrar los inconvenientes con ese producto terapéutico candidato particular. Aunque el anticuerpo tiene actividad farmacológica en este animal, los monos en estos estudios presentaban displasia fiseal caracterizada por un aumento relacionado con la dosis de condrocitos hipertrofiados, formación de placa ósea subcondral e inhibición de invasión vascular de la placa de crecimiento. No serán evidentes dichas desventajas en el uso de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, que no inhiban la unión y señalización del VEGF en condrocitos y condrocitos, que es mediada por VEGFR1.

Los datos de un estudio adicional en la farmacocinética preclínica, aumento de la dosis interespecie y distribución tisular del anticuerpo dirigido contra VEGF monoclonal, humanizado de Genentech, los describieron Lin y col. (1999). Estos estudios se llevaron a cabo en ratones, ratas, monos y conejos, estos últimos usando el anticuerpo marcado con ¹²⁵I. Los datos farmacocinéticos de ratones, ratas y monos se usaron para predecir la farmacocinética del anticuerpo homólogo humanizado usando aumento de la dosis alométrico en seres humanos. Por consiguiente se puede desarrollar información de dosis adecuada para el tratamiento de afecciones patológicas humanas, tales como la artritis reumatoide, neovascularización ocular y cáncer.

La versión humanizada del anticuerpo dirigido contra VEGF A4.6.1 (Avastin, bevacizumab) ahora está aprobada para uso clínico (Hurwitz y col., 2004). Por lo tanto, dichos datos clínicos también se pueden considerar como una fuente de referencia cuando se diseñan dosis terapéuticas para el presente tratamiento de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2. La presente invención muestra que los nuevos anticuerpos humanos son tan eficaces como A4.6.1/Avastin en estudios en ratones que llevan tumor, aunque es una ventaja la especificidad para inhibir solo acciones mediadas por el VEGFR2 del VEGF. También se hace referencia al documento WO 98/45331 para ilustrar más las dosis de anticuerpos dirigidos contra VEGF humanizados que se pueden usar en el tratamiento.

En términos de usar anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, conjugados, en terapia tumoral, se puede hacer referencia a la bibliografía científica y de patentes del éxito de suministrar una amplia variedad de productos terapéuticos a la vasculatura tumoral para lograr un efecto beneficioso. A modo de ejemplo, se hace referencia a cada una de las patentes de EE.UU. n° 5.855.866; 5.877.289; 5.965.132; 6.051.230; 6.004.555; 5.776.427; 6.004.554; 6.036.955; y 6.093.399, con el propósito de describir todavía más el uso de dichas construcciones de agente terapéutico-agente de direccionamiento. En el presente caso, las construcciones de agente terapéutico-agente de direccionamiento incluyen partes de agente de direccionamiento que ejercen un efecto antiangiogénico, que aumentará o potenciará de otro modo la actividad antitumoral del agente terapéutico unido.

Como se conoce en la técnica, hay objetivos realistas que se pueden usar como una guía en relación con el ensayo preclínico antes de proseguir al tratamiento clínico. Sin embargo, en vista del avance de otros anticuerpos dirigidos contra el VEGF en el escenario clínico, los efectos antitumorales demostrados en modelos aceptados, mostrados en el presente documento, y la seguridad mejorada de las presentes estrategias, la presente invención proporciona un

producto terapéutico con un rápido camino al tratamiento clínico. Por lo tanto, se puede usar el ensayo preclínico para seleccionar los anticuerpos, dosis o combinaciones más ventajosos.

Cualquier dosis de anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o de inmunoconjugado, o medicamento combinado, que dé como resultado cualquier efecto antiangiogénico, sistemáticamente detectable, inhibición de metástasis, destrucción de vasculatura tumoral, trombosis tumoral, necrosis y/o efecto antitumoral general definirá una invención útil. La presente invención también puede ser eficaz contra vasos corriente abajo del tumor, es decir, dirigido a al menos un subconjunto de los vasos drenantes, en particular cuando las citoquinas liberadas del tumor estarán actuando en estos vasos, cambiando su perfil antigénico.

También se entenderá que incluso en dichas circunstancias, donde los efectos antiangiogénicos y/o tumorales de la dosis de anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, o terapia combinada, se dirigen al extremo inferior del intervalo terapéutico previsto, puede ser que esta terapia todavía sea igualmente o incluso más eficaz que otras terapias conocidas en el contexto del paciente u objetivo tumoral particular. Desgraciadamente, es evidente para un médico que algunos tumores y afecciones no se pueden tratar de manera eficaz a plazo intermedio o largo, pero esto no anula la utilidad de la presente terapia, en particular donde sea al menos aproximadamente tan eficaz como las otras estrategias propuestas en general.

Al diseñar las dosis adecuadas de las construcciones de anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o inmunoconjugado, o productos terapéuticos combinados, para el tratamiento de tumores vascularizados, se puede extrapolar fácilmente de los estudios en animales descritos en el presente documento y del conocimiento en la bibliografía con el fin de llegar a las dosis adecuadas para administración clínica. Para lograr una conversión de dosis de animal a ser humano, se tiene que tener en cuenta la masa de los agentes administrados por unidad de masa del animal experimental, y preferiblemente, tener en cuenta las diferencias en el área superficial corporal (m^2) entre el animal experimental y el paciente humano. Todos dichos cálculos son bien conocidos y rutinarios para los expertos en la materia.

Por ejemplo, tomando las dosis satisfactorias en los estudios de ratón, y aplicando cálculos estándar basados en la masa y área superficial, las dosis eficaces para usar en pacientes humanos estarían entre aproximadamente 1 mg/m^2 y aproximadamente 1000 mg/m^2 , preferiblemente, entre aproximadamente 50 mg/m^2 y 500 mg/m^2 , y lo más preferiblemente, entre aproximadamente 10 mg/m^2 y aproximadamente 100 mg/m^2 . Estas dosis son adecuadas para los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 desnudos y los inmunoconjugados humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, aunque las dosis se prefieren para usar en relación con anticuerpos desnudos o no conjugados para usar como antiangiogénicos.

Por consiguiente, usando esta información, los autores de la invención contemplan que las dosis bajas útiles de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, o inmunoconjugados, para administración humana serán de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o de aproximadamente 50 mg/m^2 ; y que las dosis altas útiles de dichos anticuerpos o inmunoconjugados para administración humana serán de aproximadamente 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 925, 950, 975 o de aproximadamente 1000 mg/m^2 . Las dosis intermedias útiles de los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, o inmunoconjugados, para administración humana se contemplan que son cualquier dosis entre los intervalos bajo y alto, tal como de aproximadamente 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550 o de aproximadamente 575 mg/m^2 o más o menos.

Cualquier intervalo particular usando cualquiera de las dosis de ejemplo citadas anteriormente o cualquier valor intermedio entre los intervalos expuestos particulares, está contemplado. Cuando se usen inmunoconjugados humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, también se entenderá que los inmunoconjugados coagulantes se pueden usar en general con dosis mayores que los inmunoconjugados de toxina.

En general, se preferirán intervalos de dosis de entre aproximadamente 10-100 mg/m^2 , aproximadamente 10-90 mg/m^2 , aproximadamente 10-80 mg/m^2 , aproximadamente 20-100 mg/m^2 , aproximadamente 20-90 mg/m^2 , aproximadamente 20-80 mg/m^2 , aproximadamente 30-100 mg/m^2 , aproximadamente 30-90 mg/m^2 , aproximadamente 30-80 mg/m^2 , aproximadamente 15-100 mg/m^2 , aproximadamente 25-100 mg/m^2 , aproximadamente 35-100 mg/m^2 , aproximadamente 15-90 mg/m^2 , aproximadamente 25-90 mg/m^2 , aproximadamente 35-90 mg/m^2 , o más o menos de inmunoconjugados o anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2. No obstante se entenderá que de estos intervalos expuestos, dados los parámetros y la guía detallada presentada en el presente documento, estarán abarcadas variaciones adicionales en los intervalos activos u óptimos dentro de la presente invención.

Por lo tanto, se entenderá que dosis menores pueden ser más adecuadas en combinación con otros agentes, y que incluso se pueden tolerar dosis superiores, en particular dada la seguridad mejorada de los inmunoconjugados y anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2. El uso de anticuerpos humanos (y 5 opcionalmente, proteínas coagulantes o antiangiogénicas humanas) hace a la presente invención incluso más segura para uso clínico, reduciendo más las probabilidades de toxicidad significativa o efectos secundarios en tejidos sanos.

La intención de los regímenes terapéuticos de la presente invención es producir en general efectos antitumorales 10 significativos mientras que todavía se mantiene la dosis por debajo de los niveles asociados con toxicidad inaceptable. Además de variar la propia dosis, el régimen de administración también se puede adaptar para optimizar la estrategia de tratamiento. Un protocolo de tratamiento es administrar entre aproximadamente 1 mg/m² y aproximadamente 1000 mg/m², preferiblemente, entre aproximadamente 50 mg/m² y 500 mg/m², y lo más preferiblemente, entre aproximadamente 10 mg/m² y aproximadamente 100 mg/m² del inmunoconjugado o 15 anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o cóctel terapéutico que lo contiene, de aproximadamente 1 a 3 veces por semana, preferiblemente por administración intravenosa o intramuscular, y lo más preferiblemente, por vía intravenosa.

Al administrar las dosis particulares, se proporcionará preferiblemente una composición farmacéuticamente 20 aceptable (de acuerdo a las normas de la FDA de esterilidad, pirogenicidad, pureza y seguridad general) al paciente de manera sistémica. En general, se prefiere inyección intravenosa. También se contempla la infusión continua durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 o 2 horas o más o menos.

Naturalmente, antes del uso extendido, se llevarán a cabo ensayos clínicos. Los diferentes elementos para llevar a 25 cabo un ensayo clínico, que incluyen tratamiento y seguimiento de pacientes, serán conocidos para los expertos en la materia en vista de la presente descripción. La siguiente información se está presentando como una guía general para usar en el establecimiento de dichos ensayos.

Los pacientes elegidos para los estudios de tratamiento con anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, 30 bloqueantes de VEGFR2 no habrán respondido a al menos un transcurso de terapia convencional, y tendrán enfermedad objetivamente medible determinada por examen físico, técnicas de laboratorio, y/o procedimientos radiográficos. Se debe detener cualquier quimioterapia al menos dos semanas antes de entrar en el estudio. Cuando se empleen anticuerpos monoclonales murinos o partes de anticuerpo, los pacientes no deben tener historia de alergia a inmunoglobulina de ratón.

35 Se encontrarán ciertas ventajas en el uso de un catéter venoso central permanente con un orificio de triple luz. El anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 se debe filtrar, por ejemplo, usando un filtro de 0,22 µ, y diluir de manera adecuada, tal como con solución salina, hasta un volumen final de 100 ml. Antes del uso, la muestra de ensayo también se debe filtrar de una manera similar, y evaluar su concentración antes y después de 40 la filtración determinando la A₂₈₀. La recuperación esperada debe estar dentro del intervalo de 87 % a 99 %, y entonces se debe tener en cuenta los ajustes para la pérdida de proteínas.

Los conjugados o anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 se pueden administrar a lo largo de un periodo de aproximadamente 4-24 horas, recibiendo cada paciente 2-4 infusiones en intervalos de 2-7 45 días. La administración también se puede realizar a una velocidad constante de infusión a lo largo de un periodo de 7 días. La infusión dada a cualquier nivel de dosis debe ser dependiente de cualquier toxicidad observada. Por lo tanto, si se alcanzaba la toxicidad Grado II después de una sola infusión, o en un periodo de tiempo particular para una infusión de velocidad constante, se deben detener las dosis adicionales o la infusión de velocidad constante a menos que mejore la toxicidad. Se deben administrar dosis crecientes del anticuerpo humano dirigido contra VEGF, 50 bloqueante de VEGFR2, a los grupos de pacientes hasta que aproximadamente el 60 % de los pacientes muestre toxicidad Grado III o IV inaceptable en cualquier categoría. Las dosis que son 2/3 de este valor se definen como la dosis segura.

El examen físico, mediciones tumorales, y ensayos de laboratorio por supuesto se deben realizar antes del 55 tratamiento y en intervalos de hasta 1 mes posterior. Los ensayos de laboratorio deben incluir recuentos sanguíneos completos, creatinina del suero, creatinina-quinasa, electrolitos, urea, nitrógeno, SGOT, bilirrubina, albúmina y proteínas totales en el suero. Las muestras de suero tomadas hasta 60 días después del tratamiento se deben evaluar por radioinmunoensayo respecto a la presencia del producto terapéutico administrado, y los anticuerpos contra cualquier parte del mismo. Los análisis inmunológicos de los sueros, usando cualquier ensayo estándar tal

como por ejemplo, un ELISA o RIA, permitirán que se evalúe la farmacocinética y la depuración del anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2.

Para evaluar las respuestas antitumorales, los pacientes se deben examinar a las 48 horas a una 1 semana y
 5 nuevamente a los 30 días después de la última infusión. Cuando esté presente enfermedad palpable, se deben medir dos diámetros perpendiculares de todas las masas diariamente durante el tratamiento, en el espacio de 1 semana después del término de la terapia, y a los 30 días. Para medir la enfermedad no palpable, se pueden realizar exploraciones de CT en serie a intervalos de 1 cm a lo largo del pecho, abdomen y pelvis a las 48 horas a 1 semana y nuevamente a los 30 días. También se deben evaluar de manera histológica las muestras de tejido, y/o
 10 por citometría de flujo, usando biopsias de los sitios de enfermedad o incluso muestras sanguíneas o de fluido, si es adecuado.

Las repuestas clínicas se pueden definir por medición aceptable. Por ejemplo, se puede definir una respuesta completa por la desaparición de todo el tumor medible 1 mes después del tratamiento. Donde una respuesta parcial
 15 se puede definir por una reducción de 50 % o mayor de la suma de los productos de diámetros perpendiculares de todos los nódulos tumorales evaluables 1 mes después de tratamiento, sin sitios tumorales que muestren agrandamiento. De manera similar, se puede definir una respuesta mixta por una reducción del producto de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles de 50 % o mayor 1 mes después del tratamiento, con progreso en uno o más sitios.

20 En vista de los resultados de los ensayos clínicos, tales como los descritos anteriormente, se puede formular un régimen de tratamiento incluso más preciso. Incluso así, puede ser necesaria posteriormente alguna variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto que se trate. El médico responsable de la administración será capaz, en vista de la presente descripción, de determinar la dosis adecuada para el sujeto individual. Esta optimización y ajuste
 25 se lleva a cabo de forma rutinaria en la técnica y de ninguna manera refleja una cantidad indebida de experimentación.

G. Terapias de combinación

30 Usada para tratar enfermedades angiogénicas, tales como artritis, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Grave, reestenosis vascular, hemangioma y glaucoma neovascular (u otras enfermedades descritas anteriormente), o tumores sólidos, la presente invención se puede combinar con otras terapias.

35 Los procedimientos de tratamiento con anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, de la presente invención, se pueden combinar con cualquier otro procedimiento usado en general en el tratamiento del tumor, enfermedad o trastorno particular que presenta el paciente. Siempre que un procedimiento terapéutico particular no se sepa que sea perjudicial para la afección del paciente en sí mismo, y no contrarreste significativamente el tratamiento con anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, su
 40 combinación con la presente invención está contemplada.

En relación con el tratamiento de tumores sólidos, la presente invención se puede usar en combinación con procedimientos clásicos, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. La invención proporciona por lo tanto terapias combinadas en las cuales se usan construcciones de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF,
 45 bloqueantes de VEGFR2, de manera simultánea con, antes de, o después de la cirugía o tratamiento de radiación; o se administran a pacientes con, antes o después de agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos o antiangiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o coagulandos dirigidos.

Se prefiere en particular el uso combinado de la invención con radioterapia, productos radioterapéuticos, agentes
 50 antiangiogénicos, agentes inductores de apoptosis y fármacos antitubulina. Se han descrito anteriormente muchos ejemplos de dichos agentes en conjunto con los inmunoconjugados de la presente invención. También se puede usar por separado cualquiera de los agentes descritos inicialmente para usar como una parte de un conjugado terapéutico, pero todavía en combinación operable con la presente invención.

55 Cuando se usa uno o más agentes en combinación con la terapia de anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, no hay requisito de que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando se lleva a cabo por separado cada tratamiento. Aunque en general son deseables al menos efectos aditivos, sería beneficioso cualquier efecto antitumoral aumentado por encima de una de las terapias individuales. También, no hay requisito particular de que el tratamiento combinado presente efecto sinérgico, aunque esto es ciertamente

posible y ventajoso.

Para practicar la terapia antiangiogénica combinada, p. ej., para tratar un trastorno o enfermedad ocular u otro angiogénico, simplemente se administrará a un animal un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, en combinación con otro agente terapéutico, incluyendo otro agente antiangiogénico (segundo) de una manera eficaz para dar como resultado sus acciones terapéuticas o antiangiogénicas combinadas dentro del animal. Los agentes por lo tanto se proporcionarán en cantidades eficaces y durante periodos de tiempo eficaces para dar como resultado su presencia combinada dentro del sitio de enfermedad y sus acciones combinadas en el entorno de enfermedad, tal como el ojo.

Para lograr este objetivo, el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 y otro u otros agentes terapéuticos o antiangiogénicos se pueden administrar al animal simultáneamente, en una sola composición o como dos composiciones distintas usando diferentes rutas de administración. Alternativamente, el tratamiento con anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 puede preceder, o seguir, el otro tratamiento terapéutico o antiangiogénico, p. ej., por intervalos, que varían desde minutos a semanas y meses. Se realizará dicho tratamiento de modo que el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 y el o los otros agentes terapéuticos o antiangiogénicos ejerzan un efecto terapéutico ventajosamente combinado.

Con respecto a la terapia tumoral, para practicar la terapia antitumoral combinada, se administrará igualmente a un animal un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 en combinación con otro antineoplásico de una manera eficaz para dar como resultado sus acciones antitumorales combinadas dentro del animal. Los agentes se proporcionarán de nuevo en cantidades eficaces y durante periodos de tiempo eficaces para dar como resultado su presencia combinada dentro de la vasculatura tumoral y sus acciones combinadas en el entorno tumoral.

El anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 y los antineoplásicos se pueden administrar a un animal simultáneamente, ya sea en una sola composición, o como dos composiciones distintas usando diferentes vías de administración. Alternativamente, el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, se puede dar antes, o después del antineoplásico, p. ej., de minutos a semanas y meses de separación. El antineoplásico y el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, ejercerán un efecto ventajosamente combinado en el tumor. Muchos antineoplásicos se darán antes de la terapia antiangiogénica con anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2. Sin embargo, muchos otros antineoplásicos se administrarán simultáneamente con el anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o con posterioridad al mismo, en particular cuando se usa después de los inmunoconjugados humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2.

El uso general de combinaciones de sustancias en el tratamiento del cáncer es bien conocido. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.710.134, describe componentes que inducen necrosis en tumores en combinación con sustancias o "profármacos" no tóxicos. Las enzimas dejadas libres por procesos necróticos escinden el "profármaco" no tóxico en el "fármaco" tóxico, que conduce a la muerte de células tumorales. También, la patente de EE.UU. n° 5.747.469, describe el uso combinada de vectores víricos que codifican p53 y agentes de daño al ADN. Se puede usar cualquiera de dichos procedimientos similares con la presente invención.

En algunas situaciones, puede incluso ser deseable prolongar significativamente el periodo de tiempo de tratamiento, donde transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), o varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o incluso varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas. Esto será ventajoso en circunstancias donde un tratamiento estaba previsto para destruir sustancialmente el tumor, tal como cirugía o quimioterapia, y otro tratamiento estaba previsto para impedir la micrometástasis o re-crecimiento tumoral, tal como terapia basada en antiangiogénicos. Los antiangiogénicos se deben administrar en un tiempo cuidadoso después de la cirugía para permitir curación eficaz de la herida.

También está contemplado que se usará más de una administración ya sea del anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, o del antineoplásico. Los agentes se pueden administrar de manera intercambiable, en días o semanas alternos; o se puede dar una secuencia de tratamiento con anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2, seguido de una secuencia de terapia de antineoplásico. En cualquier caso, para lograr la regresión tumoral usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es suministrar ambos agentes en una cantidad combinada eficaz para ejercer un efecto antitumoral, independientemente de los tiempos de administración.

En términos de cirugía, se puede poner en práctica cualquier intervención quirúrgica en combinación con la presente invención. En relación con la radioterapia, está contemplado cualquier mecanismo para inducir daño al ADN localmente dentro de las células tumorales, tal como irradiación γ , rayos X, irradiación UV, microondas e incluso emisiones electrónicas y similares. El suministro dirigido de radioisótopos a células tumorales también está contemplado, y esto se puede usar en relación con un anticuerpo de direccionamiento u otros medios de direccionamiento, y preferiblemente, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2.

La terapia de citoquinas también ha probado ser una pareja eficaz para regímenes terapéuticos combinados. Se pueden usar varias citoquinas en estos procedimientos combinados. Los ejemplos de citoquinas incluyen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- β , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF α , TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ . Las citoquinas se administran de acuerdo con regímenes estándar, de acuerdo con indicaciones clínicas tales como la afección del paciente y toxicidad relativa de la citoquina. También se pueden usar uteroglobinas para prevenir o inhibir la metástasis (patente de EE.UU. n° 5.696.092).

15 G1. Agentes quimioterapéuticos

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención se pueden administrar en combinación con un agente quimioterapéutico. Se puede usar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los procedimientos de tratamiento combinado descritos en el presente documento. Los agentes quimioterapéuticos contemplados como ejemplo incluyen, p. ej., adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifeno, taxol, taxotere, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), citosina-arabinósido, ciclofosfamida, tiotepá, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatina (CDDP), aminopterina, combretastatinas y derivados y profármacos de los mismos.

Como entenderán los expertos en la materia, las dosis adecuadas de los agentes quimioterapéuticos en general serán alrededor de las ya usadas en terapias clínicas en donde los agentes quimioterapéuticos se administren solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Solo a modo de ejemplo, se pueden usar agentes tales como cisplatino, y otros agentes alquilantes de ADN. El cisplatino se ha usado ampliamente para tratar el cáncer, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 mg/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres ciclos. El cisplatino no se absorbe por vía oral y por lo tanto se debe suministrar mediante inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Los agentes útiles adicionales incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, mitosis y segregación cromosómica. Dichos compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocida como doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina y similares. Ampliamente usados en un marco clínico para el tratamiento de neoplasmas, estos compuestos se administran por inyecciones de bolo intravenoso en dosis que varían desde 25-75 mg/m² a intervalos de 21 días para la adriamicina, a 35-50 mg/m² para el etopósido por vía intravenosa o doble de la dosis intravenosa por vía oral.

Los agentes que interrumpen la síntesis y fidelidad de los precursores de polinucleótido también se pueden usar. En particular son útiles los agentes que se han sometido a ensayo amplio y están fácilmente disponibles. Como tales, se usan preferiblemente agentes tales como 5-fluorouracilo (5-FU) para tejido neoplásico, haciendo a éste agente particularmente útil para dirigirse a células neoplásicas. Aunque bastante tóxico, el 5-FU, es aplicable en una amplia variedad de vehículos, incluyendo administración tópica, sin embargo, se usa habitualmente la administración intravenosa con dosis que varían desde 3 a 15 mg/kg/día.

Los agentes quimioterapéuticos de ejemplo para terapia combinada se citan en la tabla C. Cada uno de los agentes citados son de ejemplo y no limitantes. Se envía al experto a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, capítulo 33, en particular páginas 624-652. Se presentará probablemente variación en la dosis dependiendo de la afección que se trate. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

TABLA C

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS ÚTILES EN ENFERMEDAD NEOPLÁSICA			
CLASE	TIPO DE AGENTE	EJEMPLOS	ENFERMEDAD

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS ÚTILES EN ENFERMEDAD NEOPLÁSICA			
CLASE	TIPO DE AGENTE	EJEMPLOS	ENFERMEDAD
<i>Agentes alquilantes</i>	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina (clormetina, mustina, mostaza de nitrógeno, HN ₂) Mustargen [®]	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos
		Ciclofosfamida (citofosfano) Cytosan [®] , Neosar [®] , Revimmune [®]	Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, ovario, pulmón, tumor de Wilms, cuello uterino, testículos, sarcomas de tejido blando
		Ifosfamida Mitoxana [®] , Ifex [®]	Linfomas no Hodgkinianos, sarcoma de tejido blando, sarcoma osteogénico, testicular, mama, pulmonar, cuello uterino, ovárico, óseo
		Melfalán (L-sarcolisina) Alkeran [®]	Mieloma múltiple, mama, ovario, melanoma
		Clorambucilo Leukeran [®]	Leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia primaria, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, ovario
	Etileniminas y metilmelaminas	Hexametilmelamina (Altretamina, HMM) Hexalen [®]	Ovario
		TioTEPA	Vejiga, mama, ovario
	Alquilsulfonatos	Busulfán Myleran [®] , Busulfex [®]	Leucemia granulocítica crónica
	Nitrosoureas	Carmustina BiCNU [®]	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, tumores cerebrales primarios, mieloma múltiple, melanoma maligno, glioma, glioblastoma multiforme, meduloblastoma, astrocitoma
		Lomustina (CCNU) CeeNU [®]	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, tumores cerebrales primarios, pulmonar de células pequeñas
		Semustina (metil-CCNU)	Tumores cerebrales primarios, estómago, colon
		Estreptozocina (estreptozotocina) Zanosar [®]	Insulinoma pancreático maligno, carcinoide maligno
	Triazinas	Dacarbazina (dimetiltriazenoimida, zolecarboxamida, imidazol-carboxamida) DTIC [®] , DTIC-Dome [®]	Melanoma maligno, enfermedad de Hodgkin, sarcomas de tejido blando, insulinoma pancreático maligno
		Temozolomida Temodar [®] , Temodal [®]	Astrocitoma
	Derivados de metil-hidrazina	Procarbazina (N-metilhidrazina, MIH) Matulane [®] , Natulan [®] , Indicarb [®]	Enfermedad de Hodgkin, glioblastoma multiforme
<i>Antimetabolitos</i>	Análogos de ácido fólico antimetabolitos de folato	Metotrexato (ametofterina)	Leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, micosis fungoides, mama, cabeza y cuello, pulmón, sarcoma osteogénico, glioblastoma
		Aminopterina	Leucemia
		Pemetrexed Alimta [®]	Mesotelioma pleural, cáncer pulmonar de células no pequeñas, esofágico

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS ÚTILES EN ENFERMEDAD NEOPLÁSICA			
CLASE	TIPO DE AGENTE	EJEMPLOS	ENFERMEDAD
	Análogos de pirimidina	Raltitrexed Tomudex®	Colorrectal
		Fluorouracilo (5- fluorouracilo, 5-FU, fluorouracilo, fluorodesoxiuridina) Efudex®, Carac®, Fluoroplex® Floxuridina (profármaco) FUDR®	Mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello, vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas (tópica)
		Citarabina (arabinósido de citosina, ara C) Cytosar-U®, Tarabine PFS®, Depocyt® Capecitabina (profármaco) Xeloda®	Leucemias linfocíticas agudas y granulocíticas agudas, linfoma no Hodgkiniano
		Gemcitabina Gemzar®	Cánceres pancreático, de vejiga, mama, esofágico y pulmonar de células no pequeñas, linfomas
	Análogos de purina e inhibidores relacionados	Tioguanina (tioguanina, 6-tioguanina; TG)	Leucemias granulocíticas agudas, linfocíticas agudas, granulocíticas crónicas y mieloides crónicas
		Pentostatina (2-desoxicoformicina)	Leucemia de células pilosas, micosis fungoides, leucemia linfocítica crónica
		Mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP) Purinethol®	Leucemias linfocítica aguda, granulocítica aguda y granulocítica crónica, linfoma no Hodgkiniano
		Cladribina (2CDA) Leustatin®	Leucemia de células pilosas, leucemia de células B
		Clofarabina Clolar®, Evoltra®	Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica juvenil
		Fludarabina (fludarabina-fosfato) Fludara®	Tumores malignos hematológicos
		Vinblastina (VLB)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, cáncer de mama, testículo, pulmonar de células no pequeñas
	Alcaloides de la vinca	Vincristina Oncovin®	Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms (nefroblastoma), rabdomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, de pulmón de células pequeñas
		Vindescina Eldisine®	Leucemia, linfoma, melanoma, mama, pulmón
		Vinorelbina Navelbine®	Mama, pulmón de células no pequeñas
	Podofilotoxinas Epipodofilo-toxinas	Etopósido (etopósido-fosfato) Eposin®, Etopophos®, Vepesid®, VP-16®	Testículos, de pulmón de células pequeñas y otras de pulmón, mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, leucemia granulocítica aguda, sarcoma de Kaposi, glioblastoma multiforme
		Tenipósido Vumon®, VP-16®	Leucemia linfocítica aguda

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS ÚTILES EN ENFERMEDAD NEOPLÁSICA			
CLASE	TIPO DE AGENTE	EJEMPLOS	ENFERMEDAD
<i>Productos naturales</i>	Antibióticos de antraciclina (antraciclinas)	Daunorubicina (daunomicina, rubidomicina) Cerubidine®	Leucemias granulocítica aguda y linfocítica aguda, neuroblastoma
		Doxorubicina (hidroxidaunorubicina, adriamicina) Rubex®, Doxil®	Sarcomas de tejido blando, osteogénico y otros; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, leucemias agudas; mama, genitourinario, tiroides, pulmón, estómago, ovario, tiroides, vejiga, neuroblastoma, mieloma múltiple
		Epirubicina Ellence®, Pharmorubicin®, Ebewe®	Mama, ovárico, gástrico, pulmonar; linfomas
		Idarubicina (4-desmetoxidaunorubicina) Zavedos®, Idamycin®	Leucemia mieloide aguda
		Valrubicina (Ntrifluoro-acetiladriamicin-14-valerato) Valstar®	Vejiga
	Antracenodiona	Mitoxantrona	Leucemia granulocítica aguda, mama, linfoma no Hodgkiniano
		Pixantrona	Mama, linfoma no Hodgkiniano
	Antibióticos polipeptídicos y peptídicos	Bleomicina Blenoxane®	Testículos, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y tracto genitourinario; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, carcinomas de células escamosas
		Actinomicina-D Dactinomycin®	Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, testículos, sarcoma de Kaposi
		Plicamicina (mitramicina) Mithracin®	Testículos, hipercalcemia maligna
		Mitomicina (mitomicina C)	Estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello, esofágico
	Enzimas	L-Asparaginasa Elspar®	Leucemia linfocítica aguda, tumores de células madre
	Modificadores de la respuesta biológica	Interferón-alfa (IFNα) Interferones pegilados Multiféron®, Roferon®, Pegasys®, IntronA®, PegIntron®	Leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, célula renal, ovárico, vejiga, linfomas no Hodgkinianos, micosis fungoide, mieloma múltiple, leucemia granulocítica crónica
<i>Alteradores citoesqueléticos</i>	Taxanos	Taxol (paclitaxel) Abraxane®	Mama, ovario, pulmón, cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi
		Docetaxel Taxotere®	Mama, ovario, pulmón, colorrectal, ovario, gástrico, renal, próstata, hígado, cabeza y cuello, melanoma
	Combretastatinas	Combretastatina A-4 CA-4-P	Tiroides
	Complejos de coordinación de platino	Cisplatino (cis-DDP, cisplatino)	Testículo, ovario, vejiga, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cuello uterino, endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico, linfoma
		Carboplatino Paraplatin®	Ovario, pulmón, cabeza y cuello

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS ÚTILES EN ENFERMEDAD NEOPLÁSICA			
CLASE	TIPO DE AGENTE	EJEMPLOS	ENFERMEDAD
		Oxaliplatino Eloxatin [®] , Oxaliplatino Medac [®]	Colorrectal
	Camptotecinas	Topotecano Hycamtin [®]	Ovario, pulmón
		Irinotecán (CPT-11) Camptosar	Colon
Otros agentes	Urea sustituida	Hidroxiurea (hidroxicarbamida)	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombocitosis esencial, melanoma maligno
	Adrenocorticoide	Mitotano (o,p'-DDD) Lysodren [®]	Corteza suprarrenal
	Supresor de esteroides	Aminoglutetimida Cytadren [®]	Mama
	Inhibidores de tirosina quinasa	Axitinib	Mama, carcinoma de células renales, páncreas
		Dasatinib (BMS-354825) Sprycel [®]	Leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, melanoma metastático
		Erlotinib (OSI-774) Tarceva [®]	Cáncer pulmonar de células no pequeñas, pancreático
		Gefitinib (ZD1839) Iressa [®]	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
		Imatinib (CGP57148B o STI-571) Gleevec [®] , Glivec [®]	Leucemia mielógena crónica, gastrointestinal
		Lapatinib (GW572016) Tykerb [®] , Tyverb [®]	Mama
		Sorafenib Nexavar [®]	Carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular
		Sunitinib (SU11248) Sutent [®]	Carcinoma de células renales, gastrointestinal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mama
	Receptor de tirosina quinasa	Cetuximab (anti-EGFR) Erbix [®]	Colorrectal, cabeza y cuello
		Panitumumab (anti-EGFR) Vectibix [®]	Colorrectal
	CD20	Trastuzumab (anti-HER2/neu, receptor de erbB2) Herceptin [®]	Cánceres de mama, HER2/neu
		Rituximab Rituxan [®] , MabThera [®] , Reditux [®]	Linfoma no Hodgkiniano, leucemia de células B
		Tositumomab (anti-CD20- ¹³¹ I) Bexxar [®]	Linfoma folicular, linfoma no Hodgkiniano
		Alemtuzumab (anti-CD52) Campath [®]	Leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células T
		Bevacizumab (anti- VEGF) Avastin [®]	Colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mama, carcinoma de células renales, glioblastoma multiforme, cáncer prostático refractario a hormonas, páncreas
		Gemtuzumab (anti-CD33- calquimicina) Mylotarg [®]	Leucemia mielógena aguda

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS ÚTILES EN ENFERMEDAD NEOPLÁSICA			
CLASE	TIPO DE AGENTE	EJEMPLOS	ENFERMEDAD
<i>Hormonas y antagonistas</i>	Adrenocorticoesteroides	Prednisona	Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, linfomas no Hodgkinianos, enfermedad de Hodgkin, mama, mieloma múltiple
	Progestinas	Caproato de hidroxiprogesterona, Acetato de medroxiprogesterona, Acetato de megestrol, Megace®	Endometrio, mama
	Estrógenos	Dietilestilbestrol, Etinil-estradiol, Estramustine® (derivado de mecloretamina)	Mama, próstata
	Antiestrógenos	Tamoxifeno, Nolvadex®, Istubal®, Valodex®	Mama
	Andrógenos	Propionato de testosterona, Fluoximesterona (Halotestina)	Mama
	Antiandrógenos	Flutamida (Flutamina), Eulexin®	Próstata
	Análogo de hormona de liberación de gonadotropina	Leuprolida, Lupron®, Lupron Depot®, Viadur®, Eligard®, Prostat®	Próstata, mama

G2. Antiangiogénicos

En condiciones fisiológicas normales, los humanos o animales experimentan angiogénesis solo en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, normalmente se observa angiogénesis en curación de heridas, desarrollo fetal y embrionario y formación del cuerpo lúteo, endometrio y placenta. La angiogénesis descontrolada (persistente y/o desregulada) se relaciona con varios estados de enfermedad, y se presenta durante la metástasis tumoral.

Tanto la angiogénesis controlada como descontrolada se piensa que avanzan de una manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis empieza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que revisten el lumen de los vasos sanguíneos, después sobresalen a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células que migran forman un "brote" fuera del vaso sanguíneo original, donde las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

El presente anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 se puede usar en combinación con una cualquiera o más de otras terapias antiangiogénicas. Se incluyen combinaciones con otros agentes que inhiben el VEGF, tal como otros anticuerpos neutralizantes (Kim y col, 1992; Presta y col, 1997; Sioussat y col, 1993; Kondo y col, 1993; Asano y col, 1995; Hurwitz y col, 2004), construcciones de receptores solubles (Kendall y Thomas, 1993; Aiello y col, 1995; Lin y col, 1998; Millauer y col, 1996), inhibidores de tirosina quinasa (Siemeister y col, 1998), estrategias antisentido, aptámeros de ARN y ribozimas contra el VEGF o receptores de VEGF (Saleh y col, 1996; Cheng y col, 1996). También se pueden usar variantes del VEGF con propiedades antagonistas, como se describe en el documento WO 98/16551.

Las terapias antiangiogénicas se pueden basar en proporcionar un agente antiangiogénico o en la inhibición de un agente angiogénico. Se puede lograr la inhibición de agentes angiogénicos por uno o más de los procedimientos descritos para inhibir el VEGF, incluyendo anticuerpos neutralizantes, construcciones de receptor solubles, inhibidores de molécula pequeña, antisentido, aptámeros de ARN y ribozimas, y se pueden usar todos. Por ejemplo, se puede usar anticuerpos contra la angiogenina, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.520.914. Ya que el FGF se conecta con la angiogénesis, también se puede usar inhibidores del FGF. Algunos ejemplos son los compuestos que tienen N-acetilglucosamina que alterna en la secuencia con ácido urónico 2-O-sulfatado como sus

unidades principales de repetición, incluyendo glicosaminoglicanos, tales como sulfato de arcarano. Dichos compuestos se describen en la patente de EE.UU. n° 6.028.061, y se pueden usar en combinación con esta.

Ahora se conocen numerosos inhibidores de tirosina quinasa útiles para el tratamiento de la angiogénesis, como se presenta en diferentes estados de enfermedad. Estos incluyen, por ejemplo, las 4-aminopirrol[2,3-d]pirimidinas de la patente de EE.UU. n° 5.639.757, que también se puede usar en combinación con la presente invención. Los ejemplos adicionales de moléculas orgánicas capaces de modular la transducción de señales de tirosina quinasa por el receptor VEGFR2 son los compuestos de quinazolina y composiciones de la patente de EE.UU. n° 5.792.771, a la que se hace referencia con el propósito de describir adicionalmente combinaciones para usar con la presente invención en el tratamiento de enfermedades angiogénicas.

También se ha demostrado que los compuestos de otras clases químicas inhiben la angiogénesis y se pueden usar en combinación con la presente invención. Por ejemplo, en terapia combinada se pueden usar esteroides tales como los 4,9(11)- esteroides angiostáticos y los esteroides C21-oxygenados como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.972.922. Las patentes de EE.UU. n° 5.712.291 y 5.593.990, describen la talidomida y compuestos relacionados, precursores, análogos, metabolitos y productos de hidrólisis, que también se pueden usar en combinación con la presente invención para inhibir la angiogénesis. Los compuestos de las patentes de EE.UU. n° 5.712.291 y 5.593.990, se pueden administrar de manera oral. Los agentes antiangiogénicos adicionales de ejemplo que son útiles en relación con la terapia combinada se citan en la Tabla D. Cada uno de los agentes citados en la misma son ilustrativos y de ningún modo limitantes.

TABLA D

INHIBIDORES Y REGULADORES NEGATIVOS DE LA ANGIOGÉNESIS	
Sustancias	Referencias
VEGFR1 soluble	Shibuya, 2006
Neuropilin-1 soluble(NRP-1)	Gagnon y col., 2000
Angiostatina	O'Reilly y col., 1994
Endostatina	O'Reilly y col., 1997
Angiopoyetina 2	Maisonpierre y col., 1997
Calreticulina	Pike y col., 1999
Vasostatina	Pike y col., 1998
Vasculostatina	Kaur y col., 2005
Canstatina	Kamphaus y col., 2000
Maspina	Zou y col., 1994
Fragmento de prolactina de 16 kDa	Ferrara y col., 1991; Clapp y col., 1993; D'Angelo y col., 1995; Lee y col., 1998
Péptidos laminina	Kleinman y col., 1993; Yamamura y col., 1993; Iwamoto y col., 1996; Tryggvason, 1993
Péptidos de fibronectina	Grant y col., 1998; Sheu y col., 1997
Inhibidores de la metaloproteasa tisular (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
Inhibidores de activador de plasminógeno (PAI-1, -2)	Soff y col., 1995
Factor de necrosis tumoral α (dosis alta, in vitro)	Frater-Schroder y col., 1987
TGF- β 1	RayChadhury y D'Amore, 1991; Tada y col., 1994
Interferones (IFN- α , - β , γ)	Moore y col., 1998; Lingen y col., 1998
Quimioquinas ELR-CXC: IL-12; IL-4; IL-18; SDF-1; MIG; factor de plaquetas 4 (PF4); IP-10; CXCL10	Moore y col., 1998; Hiscox y Jiang, 1997; Coughlin y col., 1998; Tanaka y col., 1997
Trombospondina (TSP), TSP-1 y TSP-2	Good y col., 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma y col., 1993; Sheibani y Frazier, 1995; Volpert y col., 1998
SPARC	Hasselaar y Sage, 1992; Lane y col., 1992; Jendraschak y Sage, 1996
2-Metoxioestradiol	Fotsis y col., 1994
Proteína relacionada con proliferina	Jackson y col., 1994
Suramina	Gagliardi y col., 1992; Takano y col., 1994; Waltenberger y col., 1996; Gagliardi y col., 1998; Manetti y col., 1998
Talidomida	D'Amato y col., 1994; Kenyon y col., 1997 Wells, 1998
Carboxiamidotriazol (CAI)	Hussain y col., 2003

Cortisona	Thorpe y col., 1993 Folkman y col., 1983 Sakamoto y col., 1986
Linomida	Vukanovic y col., 1993; Ziche y col., 1998; Nagler y col., 1998
Fumagilina (AGM-1470; TNP-470)	Sipos y col., 1994; Yoshida y col., 1998
Tamoxifeno	Gagliardi y Collins, 1993; Lindner y Borden, 1997; Haran et., 1994
Extracto de muérdago coreano (<i>Viscum album coloratum</i>)	Yoon y col., 1995
Retinoides	Oikawa y col., 1989; Lingen y col., 1996; Majewski y col. 1996
CM101	Hellerqvist y col., 1993; Quinn y col., 1995; Wamil y col., 1997; DeVore y col., 1997
Dexametasona	Hori y col., 1996; Wolff y col., 1997
Factor inhibidor de leucemia (LIF)	Pepper y col., 1995

Algunos componentes preferidos para usar en la inhibición de la angiogénesis son angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina. Dichos agentes se han descrito antes junto con los inmunoconjugados de la presente invención, pero se pueden usar en forma combinada, pero no conjugada.

5

Se ha mostrado ya que algunas terapias antiangiogénicas provocan regresiones tumorales, incluyendo el polisacárido bacteriano CM101 y el anticuerpo LM609. El CM101 es un polisacárido bacteriano que se ha caracterizado bien en su capacidad para inducir inflamación neovascular en tumores. El CM101 se une a y retícula receptores expresados en endotelio desdiferenciado que estimula la activación del sistema de complemento.

10 También inicia una respuesta inflamatoria dirigida por citoquinas que se dirige selectivamente al tumor. Es un agente antipatoangiogénico único que regula por disminución el VEGF y sus receptores. Actualmente el CM101 está en ensayos clínicos como un fármaco antineoplásico, y se puede usar en combinación con el presente documento.

La trombospondina (TSP-1) y el factor de plaquetas 4 (PF4) también se pueden usar en combinación con la presente invención. Estos son ambos inhibidores de angiogénesis que se asocian con heparina y se encuentran en los α -gránulos de las plaquetas. La TSP-1 es una glicoproteína multidominio grande de 450 kDa que es constituyente de la matriz extracelular. La TSP-1 se une a muchas de las moléculas de proteoglicano encontradas en la matriz extracelular incluyendo, HSPG, fibronectina, laminina, y diferentes tipos de colágeno. La TSP-1 inhibe la migración y proliferación de células endoteliales, in vitro y la angiogénesis in vivo. La TSP-1 también puede suprimir el fenotipo maligno y la tumorigénesis de células endoteliales transformadas. Se ha mostrado que el gen supresor tumoral p53 regula directamente la expresión de TSP-1 de modo que, la pérdida de actividad de p53 produce una reducción dramática en la producción de TSP-1 y un aumento concomitante en la angiogénesis iniciada en el tumor.

25 El PF4 es una proteína de 70 aa que es miembro de la familia de CXC-ELR de quimioquinas que es capaz de inhibir de manera potente la proliferación de células endoteliales in vitro y la angiogénesis in vivo. El PF4 administrado intratumoral o suministrado mediante un vector adenovírico es capaz de producir una inhibición del crecimiento tumoral.

30 Los interferones y los inhibidores de metaloproteinasas son otras dos clases de inhibidores angiogénicos que se presentan de manera natural que se pueden combinar con la presente invención. La actividad anti-endotelial de los interferones se conoce desde comienzos de la década de 1980, sin embargo, el mecanismo de inhibición todavía no está claro. Se sabe que pueden inhibir la migración de células endoteliales y que tienen alguna actividad antiangiogénica in vivo que posiblemente es mediada por una capacidad para inhibir la producción de promotores angiogénicos por células tumorales. Los tumores vasculares en particular son sensibles a interferón, por ejemplo, los emangiomas proliferantes se pueden tratar satisfactoriamente con IFN α .

40 Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) son una familia de inhibidores que se presentan de manera natural de metaloproteasas de matriz (MMP) que también pueden inhibir la angiogénesis y se pueden usar en protocolos de tratamiento combinado. Las MMP tienen una función importante en el proceso angiogénico puesto que degradan la matriz a través de la cual migran las células endoteliales y los fibroblastos cuando se extiende o remodela la red vascular. De hecho, se ha mostrado que un miembro de las MMP, la MMP-2, se asocia con endotelio activado a través de la integrina $\alpha v \beta 3$ presuntamente para este propósito. Si esta interacción es interrumpida por un fragmento de MMP-2, entonces la angiogénesis es regulada por disminución y se inhibe el

crecimiento de tumores.

Hay una serie de agentes farmacológicos que inhiben la angiogénesis, uno cualquiera o más de los cuales se puede usar en combinación con la presente invención. Estos incluyen AGM-1470/TNP-470, talidomida, y carboxiamidotriazol (CAI). Se encontró que la fumagilina era un potente inhibidor de la angiogénesis en 1990, y desde entonces se han desarrollado análogos sintéticos de fumagilina, AGM-1470 y TNP-470. Ambos fármacos inhiben la proliferación de células endoteliales in vitro y la angiogénesis in vivo. Se ha estudiado TNP-470 de manera extensa en ensayos clínicos humanos con datos que sugieren que la administración a largo plazo es óptima.

10 La talidomida se usó originalmente como un sedante pero se encontró que era un potente teratógeno y se interrumpió. En 1994 se encontró que la talidomida era un inhibidor de la angiogénesis. Actualmente la talidomida está en ensayos clínicos como un antineoplásico así como en un tratamiento de enfermedades oculares vasculares.

El CAI es un inhibidor sintético de pequeño peso molecular de la angiogénesis que actúa como un bloqueante del canal de calcio que previene la reorganización de la actina, la migración de células endoteliales y la propagación y extensión en colágeno IV. El CAI inhibe la neovascularización en concentraciones fisiológicas que se pueden alcanzar y es bien tolerado por vía oral por pacientes con cáncer. Los ensayos clínicos con CAI han dado estabilización de la enfermedad en 49 % de los pacientes con cáncer que tenían enfermedad progresiva antes del tratamiento.

20 Se mostró que la cortisona en presencia de heparina o fragmentos de heparina inhibía el crecimiento tumoral en ratones bloqueando la proliferación de células endoteliales. El mecanismo implicado en el efecto inhibitorio aditivo del esteroide y heparina no está claro aunque se piensa que la heparina puede aumentar la captación del esteroide por células endoteliales. Se ha mostrado que la mezcla incrementa la disolución de la membrana basal debajo de los capilares recién formados y esto también es una posible explicación para el efecto angiostático aditivo. Los conjugados de heparina-cortisol también tienen potentes efectos angiostáticos y antitumorales in vivo.

Los inhibidores específicos adicionales de la angiogénesis que incluyen, pero no se limitan a, factor anti-invasivo, ácidos retinoicos y paclitaxel (patente de EE.UU. n° 5.716.981); AGM-1470 (Ingber y col, 1990); extracto de cartílago de tiburón (patente de EE.UU. n° 5.618.925); oligómeros aniónicos de poliamida o poliurea (patente de EE.UU. n° 5.593.664); derivados de oxindol (patente de EE.UU. n° 5.576.330); derivados de estradiol (patente de EE.UU. n° 5.504.074); y derivados de tiazolopirimidina (patente de EE.UU. n° 5.599.813) también están contemplados para usar como composiciones antiangiogénicas para los usos combinados de la presente invención.

35 También se pueden usar composiciones que comprenden un antagonista de una integrina $\alpha_v\beta_3$ para inhibir la angiogénesis en combinación con la presente invención. Como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.766.591, los polipéptidos que contienen RGD y sales de los mismos, incluyendo polipéptidos cíclicos, son ejemplos adecuados de antagonistas de alfa integrina $\alpha_v\beta_3$.

40 El anticuerpo LM609 contra la integrina $\alpha_v\beta_3$ también induce remisiones tumorales. Los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ tales como LM609, inducen apoptosis de células endoteliales angiogénicas que conducen a vasos sanguíneos inactivos sin afectar. El LM609 u otros antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ también pueden trabajar inhibiendo la interacción de $\alpha_v\beta_3$ y MMP-2, una enzima proteolítica que se cree que tiene una función importante en la migración de células endoteliales y fibroblastos. Se hace referencia a la patente de EE.UU. n° 5.753.230 para describir anticuerpos contra $\alpha_v\beta_3$ (vitronectina $\alpha_v\beta_3$) para combinación con la presente invención para inhibir la angiogénesis.

La apoptosis del endotelio angiogénico en este caso puede tener un efecto cascada en reposo de la red vascular. La inhibición de la red vascular tumoral para que responda completamente a la señal de tumor para expandirse puede iniciar, de hecho, el colapso parcial o completo de la red dando como resultado la muerte de células tumorales y la pérdida del volumen tumoral. Es posible que la endostatina y la angiostatina funcionen de una manera similar. El hecho de que LM609 no afecte vasos inactivos sino que sea capaz de producir remisiones tumorales sugiere fuertemente que no todos los vasos sanguíneos en un tumor necesitan ser el objetivo para el tratamiento con el fin de obtener un efecto antitumoral.

55 También se pueden usar otros procedimientos de intervención terapéutica basados en la alteración de la señalización a través del receptor Tie2 en combinación con la presente invención, tal como el uso del receptor Tie2 soluble capaz de bloquear la activación de Tie2 (Lin y col, 1998). Se ha mostrado que el suministro de esta construcción que usa terapia génica adenovírica recombinante es eficaz en el tratamiento de cáncer y en la reducción de metástasis (Lin y col, 1998).

G3. Agentes inductores de apoptosis

También se pueden combinar de manera ventajosa agentes terapéuticos de anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 con procedimientos para inducir apoptosis. Se han descrito varios agentes inductores de apoptosis antes en relación con los inmunos conjugados de la presente invención. Se puede usar cualquier agente inductor de apoptosis en combinación con la presente invención sin que se una a un anticuerpo de la invención.

Además de los agentes inductores de apoptosis descritos anteriormente como inmunos conjugados, se ha identificado una serie de oncogenes que inhiben la apoptosis, o muerte celular programada. Los oncogenes de ejemplo en esta categoría incluyen, pero no se limitan a bcr-abl, bcl-2 (distinto de bcl-1, ciclina D1; números de acceso a GenBank M14745, X06487; patentes de EE.UU. n° 5.650.491; y 5.539.094) y miembros de la familia que incluyen Bcl-xl, Mcl-1, Bak, A1, A20. El exceso de expresión de bcl-2 se descubrió primero en linfoma de linfocitos T. El bcl-2 funciona como un oncogén por unión e inactivación de Bax, una proteína en la ruta apoptótica. La inhibición de la función de bcl-2 previene la inactivación de Bax, y permite que prosiga la ruta apoptótica.

La inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, usando secuencias de nucleótidos de sentido contrario, está contemplada para usar en la presente invención para dar mejora de la apoptosis (patente de EE.UU. n° 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

G4. Inmunotoxinas y coaguligandos

Los procedimientos de tratamiento de la invención se pueden usar en combinación con inmunotoxinas y/o coaguligandos en los cuales la parte de direccionamiento de los mismos, p. ej., anticuerpo o ligando, se dirige a un marcador relativamente específico de las células tumorales, vasculatura tumoral o estroma tumoral. En común con los agentes quimioterapéuticos y antiangiogénicos descritos anteriormente, el uso combinado de toxinas o coagulantes dirigidos producirá en general resultados antitumorales aditivos, notablemente mayores que los aditivos o incluso sinérgicos.

Hablando en general, los anticuerpos o ligandos para usar en estos aspectos adicionales de la invención reconocerán preferiblemente antígenos tumorales accesibles que son expresados preferible o específicamente en el sitio tumoral. Los anticuerpos o ligandos también presentarán preferiblemente propiedades de alta afinidad; y los anticuerpos, ligandos y conjugados de los mismos, no ejercerán efectos secundarios significativos in vivo contra tejidos normales que mantienen la vida, tal como uno o más tejidos seleccionados de corazón, riñón, cerebro, hígado, médula ósea, colón, mama, próstata, tiroides, vejiga biliar, pulmón, glándulas suprarrenales, músculo, fibras nerviosas, páncreas, piel, u otro órgano o tejido que mantiene la vida en el cuerpo humano. La expresión "efecto secundario significativo" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo, ligando o conjugado de anticuerpo, que cuando se administra in vivo, producirá solo efecto secundarios insignificantes o clínicamente tratables, tales como los que se encuentran normalmente durante la quimioterapia.

Al menos una región de unión de estos segundos antineoplásicos usados en combinación con la invención será un componente que es capaz de suministrar una toxina o factor de coagulación a la región tumoral, es decir capaz de situarse dentro de un sitio tumoral. Dichos agentes direccionables se pueden dirigir contra un componente de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral. Los agentes direccionables se unirán en general a un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral. Sin embargo, una vez que empieza la destrucción de la vasculatura tumoral y las células tumorales, se liberarán componentes internos, permitiendo el direccionamiento adicional de prácticamente cualquier componente tumoral.

Se han descrito muchos antígenos de células tumorales, cualquiera de los cuales se puede usar como un objetivo en relación con los aspectos combinados de la presente invención. Los antígenos de células tumorales adecuados para el direccionamiento de inmunotoxinas y coaguligandos incluyen los reconocidos por los anticuerpos B3 (patente de EE.UU. n° 5.242.813); ATCC HB 10573; KSI/4 (patente de EE.UU. n° 4.975.369); obtenidos de una célula que comprende los vectores NRRL B-18356 y/o NRRL B-18357; 260F9 (ATCC HB 8488); y D612 (patente de EE.UU. n° 5.183.756); ATCC HB 9796. También se puede consultar el catálogo de ATCC de cualquier año posterior para identificar otras líneas celulares adecuadas que produzcan anticuerpos dirigidos contra células tumorales.

Para dirigirse a la vasculatura tumoral, el anticuerpo o ligando de direccionamiento a menudo se unirá a un marcador expresado por, adsorbido a, inducido en o de otro modo localizado en los vasos sanguíneos intratumorales de un

- tumor vascularizado. Las moléculas objetivo expresadas adecuadas incluyen, por ejemplo, endoglina, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA (Liu y col, 1997), un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor del VEGF/VPF, un receptor de FGF, integrina $\alpha_v\beta_3$, pleyotropina y endosialina. Los objetivos adsorbidos adecuados son aquellos tales como VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se une a TIE e isoformas de fibronectina asociadas a tumor. Los antígenos inducibles de manera natural y artificial por citoquinas y coagulandos también se pueden ser objetivos tales como ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, un ligando reactivo con LAM-1, endoglina, e incluso MHC Clase II (inducible por citoquinas, p. ej., por IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-4 y/o TNF- β); y E-selectina, P-selectina, PDGF e ICAM-1 (inducible por coagulante, p. ej., por trombina, factor IX/IXa, factor X/Xa y/o plasmina).
- Se hace referencia a las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de inmunotoxinas dirigidas contra marcadores expresados, adsorbidos, inducidos o localizados de la vasculatura tumoral: patente de EE.UU. n° 6.093.399; 5.855.866; 5.965.132; 6.051.230; 6.004.555; 5.877.289; 6.004.554; 5.776.427; 5.863.538; 5.660.827 y 6.036.955.
- Los procedimientos y composiciones adicionales dirigidos a la vasculatura tumoral incluyen los aminofosfolípidos objetivo, tales como como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, que recientemente se ha descubierto que son marcadores específicos accesibles de los vasos sanguíneos tumorales. La administración de anticuerpos dirigidos contra aminofosfolípidos solos es suficiente para inducir trombosis y remisión tumoral. La presente invención por lo tanto se puede combinar de manera eficaz con anticuerpos no conjugados, dirigidos contra fosfatidilserina y/o fosfatidiletanolamina; o se pueden usar inmunoconjugados de dichos anticuerpos.
- Se hace referencia a las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de anticuerpos dirigidos contra aminofosfolípidos e inmunotoxinas: patentes de EE.UU. n° 6.406.693; 6.312.694; 6.783.760; 6.818.213; y 7.067.109. Se hace referencia además a las patentes de EE.UU. n° 6.312.694; 6.783.760; 6.818.213; y 7.067.109 con el propósito de complementar más las presentes enseñanzas con respecto al uso de conjugados de proteína de unión a aminofosfolípidos, tales como conjugados de anexina, para usar en el suministro de toxinas y coagulantes a vasos sanguíneos tumorales y para inducir trombosis y remisión tumoral.
- Los objetivos estromales tumorales adecuados incluyen componentes de la matriz extracelular o estroma tumoral, o componentes unidos en los mismos; incluyendo marcadores de membrana basal, colágeno tipo IV, laminina, heparán sulfato, proteoglicano, fibronectinas, plaquetas activadas, LIBS y tenascina. Un objetivo preferido para dichos usos es RIBS.
- Se hace referencia a las siguientes patentes con el propósito de complementar incluso más las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de agentes que se dirigen a estromas tumorales: patentes de EE.UU. n° 6.093.399; 6.004.555; 5.877.289; y 6.036.955.
- Los segundos productos terapéuticos antineoplásicos se pueden unir operativamente a cualquiera de los agentes citotóxicos o de otro modo anticelulares descritos en el presente documento para usar en el anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o las inmunotoxinas basadas en los anticuerpos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2. Sin embargo, los agentes anticelulares adecuados también incluyen radioisótopos. Se preferirán los restos de toxina, tales como la cadena A de ricina y cadena A desglucosilada (dgA).
- El segundo agente dirigido para uso opcional con la invención puede comprender un componente dirigido que sea capaz de promover la coagulación, es decir, un coagulando. Aquí, el anticuerpo o ligando de direccionamiento se puede unir directa o indirectamente, p. ej. mediante otro anticuerpo, a cualquier factor que estimule directa o indirectamente la coagulación, incluyendo cualquiera de los descritos en el presente documento para usar en el anticuerpo dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 o coagulandos basados en anticuerpos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2. Los factores de coagulación preferidos para dichos usos son el factor tisular (TF) y derivados de TF, tales como TF truncado (tTF), TF dimérico y multimérico, y TF mutante deficiente en la capacidad para activar el Factor VII.
- Las dosis eficaces de las inmunotoxinas y coagulandos para uso combinado en el tratamiento del cáncer estarán entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg, y preferiblemente, entre aproximadamente 0,8 mg/kg y aproximadamente 1,2 mg/kg, cuando se administran por vía IV, con una frecuencia de aproximadamente 1 vez por semana. Habrá necesariamente alguna variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto que se trate. El médico responsable de la administración determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

G5. Agonistas de TLR

Ahora se ha establecido que la señalización mediante receptores tipo Toll (TLR) contribuye a los efectos de antineoplásicos conocidos, incluyendo *S. choleraesuis* atenuado, BCG y taxol, cada uno de los cuales activa TLR4. En realidad, la señalización de TLR4 contribuye a los efectos antineoplásicos de la quimioterapia y radioterapia (Apetoh y col., 2007). Así como el mejor entendimiento de los mecanismos de acción de ciertos antineoplásicos conocidos, el reconocimiento de la importancia de la señalización de TLR también ha promovido el desarrollo de nuevos productos terapéuticos para el cáncer que funcionan activando los TLR.

Por lo tanto, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de cáncer en combinación con uno o más agentes que estimulan la señalización mediante un TLR, es decir, con uno o más agonistas de TLR. Al menos un primer agonista de TLR también se puede unir operativamente a un anticuerpo humano de la invención para crear un conjugado terapéutico, como se describe en el presente documento en la sección de inmunoconjugados. Se puede usar uno cualquiera o más de los siguientes u otros agonistas de TLR en los presentes tratamientos de combinación de cáncer.

Los agonistas de TLR adecuados incluyen agonistas de uno cualquiera o más de TLR1 a TLR11, preferiblemente TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 o TLR9, y lo más preferiblemente TLR4, TLR7, TLR8 o TLR9. Los agonistas de TLR1/TLR2 incluyen lipoproteínas, p. ej., OspA, y lipopéptidos triacilados, y los agonistas de TLR2 incluyen lipoproteínas bacterianas, LAM, MALP-2, GPI, glicolípidos y porinas.

Los ejemplos particulares de agonistas de TLR4 incluyen el anticuerpo dirigido contra TLR4 agonista denominado 5D24.D4 (Cohen y col., 2003), LPS, lípido A y derivados de los mismos, de los cuales actualmente se prefieren monofosforil-lípido A (MPL) y análogos de MPL. Los análogos de MPL conocidos como AGP se pueden usar como agonistas sintéticos de TLR4 en combinación con la presente invención (Alderson y col., 2006). Los agonistas que estimulan la señalización mediante TLR4 y CD14 también incluyen LPS, lípido A, MPL y análogos de MPL, así como taxol, paclitaxel, flavolipina y GIPL. Los agonistas de TLR4 OK-432 y OK-PSA se han usado para tratar cáncer de cuello uterino y carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

Los agonistas de TLR7 incluyen imiquimod, resiquimod e isatoribina (Finberg y col., 2005; Horsmans y col., 2005), el imiquimod está aprobado para usar para tratar carcinoma de células basales. Otros agonistas de TLR7 incluyen gardiquimod, loxoribina y bropirimina. El resiquimod también es un agonista de TLR8. Los agonistas de TLR9, tal como CpG, se han usado para tratar carcinoma pulmonar de células no pequeñas, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de células renales y cáncer colorrectal.

G6. ADEPT y terapia de profármaco

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención se pueden usar junto con profármacos, en donde el anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 se asocia operativamente con un componente activador de profármaco, tal como una enzima activadora de profármaco, que convierte un profármaco en la forma más activa tras el contacto con el anticuerpo. Esta tecnología se denomina en general "ADEPT", y se describe, p. ej., en los documentos WO 95/13095; WO 97/26918, WO 97/24143, y las patentes de EE.UU. n° 4.975.278 y 5.658.568.

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma de derivado o precursor de una sustancia biológica o farmacéuticamente activa que ejerce efectos reducidos citotóxicos o de otro modo anticelulares, en células objetivo, incluyendo células endoteliales de la vasculatura tumoral, en comparación con el fármaco original en el que se basa. Preferiblemente, la forma de profármaco o precursor ejerce efectos citotóxicos o anticelulares significativamente reducidos, lo más preferiblemente, insignificantes en comparación a la forma "natural" u original. Los "profármacos" son capaces de ser activados o convertidos para producir la forma más activa original del fármaco.

La capacidad técnica para hacer y usar profármacos existe dentro de la habilidad del experto. Willman y col. (1988) y Stella y Himmelstein (1985), se hace referencia a cada uno de ellos con el propósito de complementar adicionalmente la descripción y enseñanza con respecto a cómo hacer y usar diferentes profármacos. Las construcciones de profármaco de ejemplo que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a profármacos que contienen fosfato (patente de EE.UU. n° 4.975.278), profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos basados en péptidos (patentes de EE.UU. n° 5.660.829;

5.587.161; 5.405.990; WO 97/07118), profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados (patentes de EE.UU. nº 5.561.119; 5.646.298; 4.904.768. 5.041.424), profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida (patente de EE.UU. nº 4.975.278), profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida e incluso 5-fluorocitosina (patente de EE.UU. nº 4.975.278) y profármacos de 5-fluorouridina y similares.

El tipo de agente terapéutico o fármaco citotóxico que se puede usar en la forma de profármaco prácticamente no tiene límites. Se preferirán los agentes más citotóxicos para dicha forma de suministro, frente, por ejemplo, al suministro de coagulantes, que son menos preferidos para usar como profármacos. Todo lo que se requiere al formar el profármacos es diseñar una construcción de modo que el profármaco sea sustancialmente inactivo y el fármaco "liberado" o activado tenga actividad sustancial, o al menos suficiente para el propósito previsto.

Se conocen varias mejoras en los profármacos originales y están contempladas para usar con el presente documento, como se describe en los documentos WO 95/03830; EP 751.144 (antraciclinas); WO 97/07097 (ciclopropilindoles); y WO 96/20169. Por ejemplo, profármacos con Km reducidas se describen en la patente de EE.UU. nº 5.621.002, que se pueden usar en el contexto de la presente invención. La terapia de profármacos que se lleva a cabo de manera intracelular también se conoce, como se ilustra en el documento WO 96/03151, y se puede poner en práctica con el presente documento.

Para usar en ADEPT, el agente que activa convierte el profármaco en el fármaco más activo, se une operativamente al anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2. El anticuerpo humano dirigido contra VEGF bloqueante de VEGFR2 por lo tanto sitúa la capacidad convertidora de profármaco dentro del sitio angiogénico, preferiblemente, dentro de la vasculatura y estroma tumoral, de modo que el fármaco activo solo se produce en dichas regiones y no en la circulación o en tejidos sanos.

Las enzimas que se pueden unir a los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2, para funcionar en la activación del profármaco incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina para usar en combinación con profármacos que contienen fosfato (patente de EE.UU. nº 4.975.278); arilsulfatasa para usar en combinación con profármacos que contienen sulfato (patente de EE.UU. nº 5.270.196); peptidasas y proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasa (patentes de EE.UU. nº 5.660.829; 5.587.161; 5.405.990) y catepsinas (incluyendo catepsina B y L), para usar en combinación con profármacos basados en péptidos; D-alanilcarboxipeptidasas para usar en combinación con profármacos modificados por D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa para usar en combinación con profármacos glicosilados (patentes de EE.UU. nº 5.561.119; 5.646.298); β -lactamasa para usar en combinación con profármacos que contienen β -lactama; penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa (patente de EE.UU. nº 4.975.278) o penicilina G amidasa, para usar en combinación con fármacos derivatizados en sus nitrógenos amino con grupos fenoxiacetamida o fenilacetamida; y citosina desaminasa (patentes de EE.UU. nº 5.338.678; 5.545.548) para usar en combinación con profármacos basados en 5-fluorocitosina (patente de EE.UU. nº 4.975.278).

Los anticuerpos con actividad enzimática, conocidos como anticuerpos catalíticos o "abzimas", también se pueden usar para convertir profármacos en fármacos activos. Las abzimas basadas en anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 forman por lo tanto otro aspecto de la presente invención. La capacidad técnica para hacer abzimas también está en la habilidad del experto en la materia, como se ilustra por Massey (1987), al que se hace referencia con el propósito de complementar la enseñanza de abzimas. Los anticuerpos catalíticos capaces de catalizar la rotura de un profármaco en la posición de carbamato, tal como un arilcarbamato de mostaza de nitrógeno, se contemplan adicionalmente como se describe en el documento EP 745.673.

G7. Combinaciones oculares

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la invención se pueden usar en combinación con otras terapias para tratar enfermedades oculares y enfermedades oculares angiogénicas, incluyendo retinopatía diabética, degeneración macular, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma neovascular y otras enfermedades oculares descritas anteriormente. Los anticuerpos se pueden combinar con cualquier otro procedimiento usado en general en el tratamiento de enfermedades oculares, incluyendo cirugía.

Con respecto a las combinaciones con otros agentes terapéuticos, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 se pueden administrar antes, después o sustancialmente al mismo tiempo que el otro agente terapéutico. Se puede lograr administración sustancialmente simultánea de una composición individual, o de dos composiciones distintas.

Con respecto a la neovascularización coroidea, tal como la asociada con degeneración macular, degeneración macular asociada a la edad (AMD) y otras indicaciones oculares, algunas combinaciones preferidas de la invención son las que usan un segundo agente que bloquea, inhibe, reduce, regula por disminución o antagoniza SPARC (proteína segregada, ácida y rica en cisteína) (Nozaki y col., 2006; documento U.S. 2006/0135423). Puesto que los anticuerpos de la invención ya bloquean la activación de VEGFR2, pero no la activación de VEGFR1, su combinación con uno o más agentes que bloquean SPARC formará un procedimiento particularmente eficaz para reducir más la angiogénesis inducida por VEGF en el ojo.

10 Los inhibidores o antagonistas de SPARC incluyen, por ejemplo, los de los mismos tipos moleculares que se han desarrollado satisfactoriamente contra el propio VEGF. Los inhibidores de SPARC de ejemplo incluyen por lo tanto anticuerpos dirigidos contra SPARC inhibidores y fragmentos de unión al antígeno de los mismos (p. ej., Sweetwyne y col, 2004); estrategias de sentido contrario, tales como aptámeros de ARN y aptámeros de ARN/ADN, ARN de silenciadores (siARN o ARNi) que silencian o interfieren con la expresión de SPARC; ribozimas; y otros inhibidores de proteínas, péptidos y moléculas pequeñas. Muchos de dichos inhibidores de SPARC, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales y siARN, están disponibles en el comercio, por ejemplo, de Sigma/Aldrich, Santa Cruz Biotechnology, Inc., R&D Systems. Por lo tanto se puede usar uno cualquiera o más de los inhibidores de SPARC junto con la presente invención para bloquear, inhibir, reducir, regular por disminución o antagonizar más los niveles o actividad de SPARC, a nivel de ADN, ARN y/o de proteína.

20 **H. Diagnóstico y formación de Imágenes**

La presente invención proporciona además procedimientos de diagnóstico y formación de imágenes in vitro e in vivo. Dichos procedimientos son aplicables para usar en la generación de información de diagnóstico, pronóstico o formación de imágenes para cualquiera enfermedad angiogénica, como se ilustra para la artritis, psoriasis y tumores sólidos, pero incluyendo todas las enfermedades angiogénicas descritas en el presente documento. Fuera del campo del diagnóstico y formación de imágenes tumorales, estos aspectos de la invención son más preferidos para usar en los ensayos de diagnóstico in vitro, preferiblemente donde las muestras se pueden obtener de manera no invasiva y ensayar en ensayos de alto rendimiento y/o donde se desee el diagnóstico clínico inequívoco y la confirmación.

H1. Procedimientos y kits de Inmunodetección

En realizaciones aún adicionales, la presente invención se refiere a procedimientos de inmunodetección para la unión, purificación, eliminación, cuantificación o detección en general de otro modo del VEGF y para diagnosticar enfermedades angiogénicas. Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 de la presente invención se pueden usar para detectar el VEGF in vivo (ver más adelante), en muestras aisladas de tejido, biopsias o hisopos y/o en muestras homogeneizadas de tejido. Dichos procedimientos de detección tienen utilidad diagnóstica evidente, pero también tiene aplicaciones en muestras no clínicas, tal como en la valoración de muestras de antígeno, y similares.

Las etapas de diferentes procedimientos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tal como p. ej., Nakamura y col. (1986). En general, los procedimientos de inmunounión incluyen la obtención de una muestra sospechosa de contener VEGF y poner en contacto la muestra con anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF bloqueantes de VEGFR2 en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos. En dichos procedimientos, el anticuerpo se puede unir a un soporte sólido, tal como en la forma de una matriz de columna, y la muestra sospechosa de contener VEGF se aplicará al anticuerpo inmovilizado.

Más preferiblemente, los procedimientos de inmunounión incluyen procedimientos para detectar o cuantificar la cantidad de VEGF en una muestra, procedimientos que requieren la detección o cuantificación de cualquier complejo inmunitario formado durante el proceso de unión. Aquí, se obtendrá una muestra sospechosa de contener VEGF y se pondrá en contacto la muestra con un anticuerpo de acuerdo con el presente documento y después se detectará o cuantificará la cantidad de complejos inmunitarios formados bajo las condiciones específicas.

55 La muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra que sea sospechosa de contener VEGF, en general de un animal o paciente sospechoso de tener una enfermedad angiogénica. Las muestras pueden ser una sección o muestra de tejidos, una biopsia, un hisopo o muestra de ensayo más pequeña, un extracto homogenizado de tejido o formas separadas o purificadas de éstos.

La puesta en contacto de la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios (complejos inmunitarios primarios) en general es una cuestión de adición simplemente de una composición de anticuerpo a la muestra y la incubación de la mezcla durante un período de tiempo suficientemente prolongado para que los anticuerpos formen complejos inmunitarios con, es decir, se unan a, cualquier VEGF presente. Después de este tiempo, la composición de muestra-anticuerpo, tal como una sección de tejido, placa de ELISA, transferencia en mancha o transferencia western, se lavará en general para eliminar cualquier especie de anticuerpo unida de manera no específica, permitiendo que se detecten solo los anticuerpos unidos específicamente dentro de los complejos inmunitarios primarios.

10

La detección de formación de inmunocomplejo es bien conocida en la técnica y se puede lograr mediante la aplicación en numerosos procedimientos. Estos procedimientos se basan en general en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquier etiqueta o marcador radioactivo, fluorescente, biológico o enzimático conocido en la técnica. Las patentes de EE.UU. que se refieren al uso de dichos marcadores incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. En general, se prefiere el uso de enzimas que generan un producto coloreado tras el contacto con un sustrato cromogénico. También se puede usar el ligando secundario de unión, tal como un segundo anticuerpo o una estructura de unión a ligando de biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

15

20 Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, usados en la detección, se pueden unir ellos mismos a un marcador detectable, en donde simplemente se detectará entonces este marcador, permitiendo que se determine la cantidad de los inmunocomplejos primarios en la composición.

Preferiblemente, los inmunocomplejos primarios se detectan por medio de un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión para los anticuerpos de la invención. En dichos casos, el segundo ligando de unión se puede unir a un marcador detectable. El segundo ligando de unión es a menudo el mismo un anticuerpo, y por lo tanto se puede denominar un anticuerpo "secundario". Los inmunocomplejos primarios se ponen en contacto con el ligando de unión secundario, marcado, o anticuerpo, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios después se lavan en general para eliminar cualquier anticuerpo o ligando secundario, marcado, no unido de manera específica, y después se detecta el marcador restante en los inmunocomplejos secundarios.

25

30

Los procedimientos adicionales incluyen la detección de inmunocomplejos primarios por un procedimiento de dos etapas. Un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión para el primer anticuerpo se usa para formar inmunocomplejos secundarios, como se ha descrito anteriormente. Después del lavado, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con un tercer ligando o anticuerpo de unión que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, de nuevo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se une a un marcador detectable, que permite la detección de los inmunocomplejos terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar amplificación de señal, si así se desea.

35

40

En el diagnóstico o seguimiento clínico de pacientes con una enfermedad angiogénica, la detección del VEGF, o un aumento en los niveles de VEGF, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal es indicativa de un paciente con una enfermedad angiogénica.

45

Sin embargo, como conocen los expertos en la materia, dichos diagnóstico clínico probablemente no se hará basándose en este procedimiento en el aislamiento. Los expertos en la materia están muy familiarizados con la diferenciación entre expresión significativa de un biomarcador, que representa una identificación positiva, y la expresión de bajo nivel o de fondo de un biomarcador. De hecho, con frecuencia se usan niveles de expresión de fondo para formar un "corte" por encima de lo cual la mayor tinción se puntuará como significativa o positiva.

50

H2. Formación de imágenes

Estos aspectos de la invención se prefieren para usar en procedimientos de formación de imágenes de tumores y procedimientos combinados de tratamiento tumoral y formación de imágenes. Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 que se unen a uno o más agentes detectables están contemplados para usar en la formación de imágenes, por sí mismos, o para la preformación de imágenes del tumor para formar una imagen fiable antes del tratamiento. Dichas composiciones y procedimientos también se pueden aplicar a la formación de imágenes y diagnóstico de cualquier otra enfermedad o afección angiogénica, en particular tumores no

55

malignos, aterosclerosis y afecciones en las cuales se desea una imagen interna para propósitos de diagnóstico o pronóstico o para diseñar el tratamiento.

Los anticuerpos de la formación en imágenes de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, comprenderán en general un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 unido operativamente, o conjugado a un marcador detectable. Los "marcadores detectables" son compuestos o elementos que se pueden detectar debido a sus propiedades funcionales específicas, o características químicas, cuyo uso permite que el componente al cual se unen se detecte, y se cuantifique además si se desea. En los conjugados de anticuerpo para protocolos de diagnóstico in vivo o los marcadores de los "procedimientos de formación de imágenes" se requiere que se puedan detectar usando procedimientos no invasivos.

En la técnica se conocen muchos agentes adecuados de formación de imágenes, así como procedimientos para su unión a anticuerpos y ligandos de unión (véase, p. ej., patentes de EE.UU. n° 5.021.236 y 4.472.509). Algunos procedimientos de unión implican el uso de un complejo de quelato metálico que usa, por ejemplo, un agente quelador orgánico tal como DTPA unido al anticuerpo (patente de EE.UU. n° 4.472.509). También se pueden hacer reaccionar anticuerpos monoclonales con una enzima en presencia de un agente acoplador tal como glutaraldehído o peryodato. Se preparan conjugados con marcadores de fluoresceína en presencia de estos agentes acopladores o por reacción con un isotiocianato.

Un ejemplo de marcadores detectables son los iones paramagnéticos. En este caso, los iones adecuados incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III), con el gadolinio que es particularmente preferido.

Los iones útiles en otros contextos, tal como formación de imágenes por rayos X, incluyen, pero no se limitan a, lantano (III), oro (III), plomo (II), y especialmente bismuto (III). Los marcadores fluorescentes incluyen rodamina, fluoresceína y renografin. Se unen con frecuencia la rodamina y fluoresceína por un compuesto intermedio de isotiocianato.

En el caso de isótopos radioactivos para aplicaciones diagnósticas, los ejemplos adecuados incluyen ¹⁴C, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁶⁷Co, ⁶⁷Eu, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Ga, ³H, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ⁵⁹Fe, ³²P, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁷⁵Se, ³⁵S, ^{99m}Tc, ⁹⁰Y, ¹²⁵I. A menudo se prefiere el ¹²⁵I para usar en algunas realizaciones, y también se prefieren con frecuencia el ^{99m}Tc e ¹¹¹In debido a su menor energía e idoneidad para detección de largo alcance.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, radioactivamente marcados, para usar en la presente invención, se pueden producir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los grupos funcionales intermedios que se usan con frecuencia para unir iones metálicos radioisótopos a anticuerpos son ácido dietiltrieminapentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminatetracético (EDTA).

También se pueden yodar anticuerpos monoclonales por contacto con yoduro de sodio o potasio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa. Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden marcar con ^{99m}Tc por proceso de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo pertecnato con solución estannosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna de Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna; o por técnicas de marcaje directo, p. ej., incubando pertecnato, un agente reductor tal como SNCl2, una solución tampón tal como solución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo.

Se puede usar cualquiera de los tipos anteriores de anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2, marcados de manera detectable en la formación de imágenes o aspectos combinados de formación de imágenes y tratamiento de la presente invención. Son igualmente adecuados para usar en diagnóstico in vitro. Las dosis para realizaciones de formación de imágenes in vivo en general son menos que para terapia, pero también dependen de la edad y del peso del paciente. Debería ser suficiente dosis de una vez.

Los procedimientos de diagnóstico o formación de imágenes, in vivo, comprenden en general administrar a un paciente una cantidad diagnósticamente eficaz de un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 que se conjuga a un marcador que es detectable por procedimientos no invasivos. El conjugado de anticuerpo-marcador se deja suficiente tiempo para localizar y unirse al VEGF dentro del tumor. El paciente después se expone a un dispositivo de detección para identificar el marcador detectable, formando así una imagen del tumor.

H3. Kits de diagnóstico

En realizaciones todavía adicionales, la presente invención proporciona kits de diagnóstico, que incluyen kits tanto de inmunodetección como de formación de imágenes, para usar con los procedimientos de inmunodetección y formación de imágenes, descritos anteriormente. Por consiguiente, los anticuerpos humanos dirigidos contra VEGF, bloqueantes de VEGFR2 se proporcionan en el kit, comprendidos en general dentro de un envase adecuado.

Para inmunodetección, los anticuerpos se pueden unir a un soporte sólido, tal como un pocillo de una placa de microvaloración, aunque se prefieren soluciones de anticuerpo o polvos para reconstitución. Los kits de inmunodetección comprenden preferiblemente al menos un primer reactivo de inmunodetección. Los reactivos de inmunodetección del kit pueden tomar una cualquiera de una variedad de formas, incluyendo los marcadores detectables que estén asociados con o unidos al anticuerpo determinado. También están contemplados los marcadores detectables que se asocian con o se unen a un ligando secundario de unión. Los ligandos secundarios de ejemplo son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión para el primer anticuerpo.

Los reactivos de inmunodetección, adecuados, adicionales para usar en los presentes kits incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo, junto con un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando unido el tercer anticuerpo a un marcador detectable. Como se ha indicado antes, se conocen en la técnica una serie de marcadores de ejemplo y todos estos marcadores se pueden usar en relación con la presente invención. Estos kits pueden contener conjugados de anticuerpo-marcador ya sea en una forma completamente conjugada, en la forma de compuestos intermedios, o como restos separados que van a conjugar el usuario del kit.

Los kits de formación de imágenes comprenderán preferiblemente un anticuerpo humano dirigido contra VEGF, bloqueante de VEGFR2 que ya está unido a un marcador detectable in vivo. Sin embargo, se pueden suministrar por separado el marcador y el medio de unión.

Cualquier kit puede comprender además agentes de control, tales como composiciones adecuadamente en partes alícuotas de VEGF, ya sea marcados o no marcados, como se puede usar para preparar una curva patrón para un ensayo de detección. Los componentes de los kits se pueden envasar ya sea en medios acuosos o en forma liofilizada.

El medio de recipiente de los kits incluirá en general al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio de recipiente, en el cual se puede poner el anticuerpo o antígeno, y preferiblemente, en partes alícuotas de forma adecuada. Donde se proporciona un segundo o tercer ligando de unión o componente adicional, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el cual se puede poner este ligando o componente. Los kits también pueden incluir otros reactivos de diagnóstico para usar en el diagnóstico de una cualquiera o más enfermedades angiogénicas. Preferiblemente, se usarán segundos diagnósticos no basados en la unión del VEGF.

Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el anticuerpo, y cualquier otro recipiente de reactivos en confinamiento cercano para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los cuales están contenidos los viales deseados.

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Clon EJ173-112-C11 (r84 scFv)		
1	Dominio VH (nt)	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTAT GCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTG AAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATC TACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCAT TATACCTTTTAACGGTATGGACGTCTGGGGCC AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA Véase la figura 1
2	Dominio VL (nt)	GACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCA ACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA Véase la figura 1
3	Dominio VH (aa)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT MTEDTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVR GVIIIPFNGMDVWGQGTTVTVSS Véase la figura 1
4	Dominio VL (aa)	DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK Véase la figura 1
5	Pesada CDR1	SYAIS
6	Pesada CDR2	GFPEDGETIYAQKFQG
7	Pesada CDR3	GRSMVRGVIIIPFNGMDV
8	Ligera CDR1	RASQSISSYLN
9	Ligera CDR2	AASSLQS
10	Ligera CDR3	QQSYSTPLT
11	Pesada FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGGTFS
12	Pesada FR2	WVRQAPGQGLEWMG
13	Pesada FR3	RVTMTEDTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
14	Pesada FR4	WGQGTTVTVSS
15	Ligera FR1	DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITC

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Clon EJ173-112-C11 (r84 scFv)		
16	Ligera FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
17	Ligera FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC
18	Ligera FR4	FGGGTKVEIK
19	Ligador	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
20	clon de scFv entero (nt)	Véase la figura 1
21	clon de scFv entero (aa)	Véase la figura 1
IgG de longitud completa r84		
22	Cadena pesada de IgG (nt)	Véase el ejemplo 6
23	Cadena ligera de IgG (nt)	Véase el ejemplo 6
24	Cadena pesada de IgG (aa)	Véase el ejemplo 6
25	Cadena ligera de IgG (aa)	Véase el ejemplo 6
26	Dominio VH de IgG (nt)	Véase el ejemplo 6
27	Dominio VL de IgG (nt)	Véase el ejemplo 6

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Selección de anticuerpos

- 5 El VEGF es un regulador clave de la angiogénesis fisiológica durante la embriogénesis, crecimiento esquelético, y funciones reproductivas. La señalización de VEGF a través de la interacción con el receptor de tirosina quinasa, VEGFR2, también es importante en la angiogénesis patológica, incluyendo la asociada con crecimiento tumoral. Dada la necesidad de anticuerpos humanos específicos terapéuticos, que bloqueen la angiogénesis, se han
- 10 identificado anticuerpos humanos que son reactivos contra un epítipo en el VEGF que bloquean de manera específica y sustancial su interacción con VEGFR2 (KDR/Flk-1), pero no bloquean de manera sustancial su interacción con VEGFR1 (Flt-1).

- Se clonaron formas de cadena sencilla de los anticuerpos en el plásmido pHOG21 (Kipriyanov y col., 1996; 1997)
- 15 (figura 9A y figura 9B) (en los sitios de restricción NcoI y NotI), que contiene los epítopos de marca c-myc y 6xHis. Se transformaron células de *E. coli*, XL-1 azul, se seleccionaron en placas de ampicilina y el scFv se expresó tras inducción por IPTG. Se ensayó por ELISA la actividad biológica selectiva contra el VEGF de los scFv purificados. La actividad biológica selectiva se confirmó además por ensayos competitivos de ELISA usando el anticuerpo murino 2C3, que bloquea de manera específica la interacción de VEGF y VEGFR2 y no la interacción de VEGF y VEGFR1
- 20 (Brekken y col., 1998; 2000). También, Biacore mostró la unión de los anticuerpos scFv a VEGF-A inmovilizado. También se evaluó la unión a VEGF murino así como a VEGF humano.

A. Secuenciación

- 25 Se muestran las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de un clon productor de anticuerpo preferido. El anticuerpo se designa como EJ173/112-C11 (r84/PGN311) y se ha producido tanto en una forma de scFv (ejemplo 1 y figura 1) y en una forma de IgG de longitud completa (ejemplo 6). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de una forma de cadena sencilla de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se muestran en la figura 1 y en la tabla 1. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de las
- 30 cadenas ligera y pesada de una forma de IgG de longitud completa de r84/PGN311 se muestra en el ejemplo 6. Las regiones CDR y armazón de las cadenas ligera y pesada de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se muestran en la tabla 1.

Ejemplo 2: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se une al VEGF con alta afinidad

Para confirmar la especificidad del anticuerpo, se ensayó la unión de la forma scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) por ELISA contra el VEGF-A humano en placa (obtenido de Dr. Rolf A. Brekken, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas). De forma breve, se colocaron en una placa de poliestireno 2 µg/ml de VEGF-A. Después, se añadió
 5 scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) purificado 20 µg/ml al primer pocillo, y se valoró con diluciones de 3 veces. Se detectó el scFv unido con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el marcador c-myc (Invitrogen) y anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón, secundario, conjugado con HRP.

Los resultados de ELISA mostraron que scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) (figura 2) se unía al VEGF y de
 10 manera importante, tenía una mayor señal de unión, y por lo tanto mayor afinidad, en comparación a su clon madre. El anticuerpo B9 murino se usa como un control positivo y es un anticuerpo scFv murino contra VEGF-A humano (obtenido de Dr. Philip E. Thorpe, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas).

El EJ173/112-C11 (r84/PGN311) mostró características beneficiosas adicionales con respecto al clon madre. Se
 15 mostró que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) tiene una mayor estabilidad en suero y una menor tendencia a formar agregados en el formato scFv en comparación con el clon madre (datos no mostrados).

Barajado de región variable de la cadena pesada de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) con siete cadenas pesadas diferentes de otros anticuerpos dirigido contra VEGF

20 La región variable de la cadena ligera de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se combinó con siete regiones variables de cadenas pesadas diferentes derivadas de otros clones de anticuerpo dirigido contra VEGF distintos de r84/PGN311 para confirmar la importancia de la región variable de la cadena ligera de r84/PGN311 en el mantenimiento de la propiedad de unión a VEGF. Los clones resultantes se expresaron y purificaron mediante su marcador His en
 25 columnas NiNTA. Después de la purificación, se determinó la concentración, y se ejecutó un ELISA contra VEGF-A humano en placa. Se añadieron 20 µg/ml de scFv purificado y el scFv unido se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra marcador c-myc (Invitrogen) y anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón secundario conjugado a HRP.

30 Se mostró que tres de las siete combinaciones de región variable de cadena ligera de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) con regiones variables de cadenas pesadas derivadas de otros clones de anticuerpo dirigido contra VEGF mostraron unión significativa al VEGF en este ELISA. Ésta es una proporción muy razonable y demuestra que la región variable de cadena ligera de r84/PGN311 es importante para mantener la unión a VEGF y también que se pueden identificar fácilmente otras regiones variables de cadena pesada que se pueden combinar con esta región variable de cadena
 35 ligera para dar lugar a anticuerpos que se unen a VEGF.

Ejemplo 3: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) compete con 2C3 murino

Para demostrar adicionalmente la especificidad del anticuerpo, se probó la unión de ScFv de EJ173/112-C11
 40 (r84/PGN311) en presencia de dos concentraciones de 2C3 en un ELISA contra VEGF-A en placa. De manera breve, se pusieron en placa 2 µg/ml de VEGF-A en una placa de poliestireno. Después, se añadió 1 µg/ml de scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) purificado, el clon madre o scFv B9 murino (figura 3) a seis pocillos paralelos, de los cuales dos contenían 0,1 µg y dos contenían 1 µg de IgG 2C3 murina, dando como resultado una concentración final de 1 y 10 µg/ml, respectivamente, de IgG 2C3. El scFv unido restante se detectó con un anticuerpo monoclonal
 45 de ratón dirigido contra marcador c-myc conjugado con HRP (Invitrogen).

La unión de scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) al VEGF se redujo por competición con concentraciones crecientes de IgG 2C3. Estos resultados muestran por lo tanto que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) compete de manera efectiva con el anticuerpo 2C3 por la unión al VEGF, indicando que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se une
 50 sustancialmente al mismo epítipo que 2C3.

Ejemplo 4: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se une a VEGF humano y de ratón

Se determinó la unión de scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) al VEGF humano y murino. Se pusieron en
 55 inmunoplasmas de poliestireno 1 µg/ml de VEGF murino (R&D Systems 493-MV-005/CF, VEGF164 murino exento de vehículo) y VEGF humano. Se añadieron 10 µg/ml de scFv purificado y se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra marcador c-myc (Invitrogen) y anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón secundario conjugado con HRP.

Los resultados mostraron que scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) (figura 4) se une tanto a VEGF murino como a VEGF humano.

Además, se usó un Biacore T100 para evaluar la afinidad de unión de las formas de scFv de r84 y su clon madre al VEGF de ratón. Para este fin, se inmovilizaron 1000 UR de VEGF₁₆₄ de ratón recombinante (493-MV/CF, R&D Systems) en un chip CM5 (Biacore), y se hizo fluir una serie de diluciones (100 nM y diluciones de 2 veces) de scFv monomérico con un caudal de 50 µl/min. La afinidad de unión expresada como la K_D se calculó por el modelo de ajuste 1:1 usando el software que corresponde a la máquina Biacore T100. Los valores de K_D se calcularon como $1,0 \times 10^{-8}$ M para EJ173-112-C11 (r84/PGN311) y $4,0 \times 10^{-8}$ M para el clon madre. Por lo tanto r84/PGN311 muestra una mayor afinidad de unión que el clon madre por el VEGF murino.

Estos resultados indican que este anticuerpo seleccionado (r84/PGN311) es adecuado para usar tanto en estudios preclínicos en ratones como para uso en seres humanos.

Como se detalla más adelante en el ejemplo 6, se han generado formas de IgG quiméricas murinas y completamente humanas del anticuerpo r84. Los estudios de unión de ELISA confirmaron que cada uno de estos anticuerpos r84 en el formato IgG también se une tanto al VEGF murino como al VEGF humano (figura 19). Estos resultados muestran otra ventaja del anticuerpo r84 completamente humano seleccionado frente al anticuerpo 2C3, puesto que 2C3 no presenta unión significativa al VEGF murino.

La ausencia de unión significativa de 2C3 al VEGF murino se ha demostrado en un ensayo ELISA indirecto. En este ensayo, se evaluó la interacción de 2C3 con VEGF humano y de ratón así como con otros miembros de la familia de VEGF.

Los ensayos ELISA indirectos se realizaron esencialmente como se describe en Brekken y col., *Cancer Research* 1998 y 2000. De forma breve, se compraron varios factores de crecimiento, es decir, VEGF-A humano (VEGF), VEGF de ratón, PIGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, de R&D Systems y se aplicaron como revestimiento en los pocillos de una placa de ELISA (50 µl/pocillo con 0,5 g/ml en tampón sensibilizador, durante la noche a 4°C). Los pocillos se bloquearon en CAH al 5% (hidrolizado ácido de caseína, Sigma, completad en PBS) durante 1 hora a 37°C y se incubó por triplicado con el anticuerpo dirigido contra VEGF 2C3 1,0 µg/ml durante 2 horas a temperatura entorno. La unión se detectó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ya sea anticuerpo dirigido contra IgG humana o de ratón, diluido 1:5000). Los pocillos se revelaron con TMB (un sustrato colorimétrico para HRP) y la absorbancia se leyó a 450 nM. Los valores medios de absorbancia son como sigue: VEGF-A humano (3,07), VEGF de ratón (0,09) que era el mismo que la señal de fondo, PIGF (0,1), VEGF-B (0,09), VEGF-C (0,09) y VEGF-D (0,12).

Los resultados demuestran que 2C3 se une al VEGF-A humano pero no reacciona con VEGF-A de ratón, PIGF, VEGF-B, VEGF-C, o VEGF-D. Este ensayo se ha reproducido varias veces con los mismos resultados.

Se han obtenido pruebas adicionales de que la forma de IgG del anticuerpo r84/PGN311 se une al VEGF de ratón, mientras que 2C3 y Avastin no se unen al VEGF de ratón, en experimentos en los que se han evaluado los niveles de VEGF de ratón en el suero en animales tratados con r84, 2C3 y Avastin.

Los sueros de animales que llevan tumor tratados con una IgG de control (Synagis), avastin, 2C3 o r84 se recogieron y se analizó por ELISA el nivel de VEGF de ratón usando un kit de R&D systems. Además, algunas muestras de suero de ratones tratados con r84 se inmunoredujeron drásticamente de todos los anticuerpos por incubación con perlas de proteína G.

Los resultados se muestran en la figura 24. El nivel en el suero de VEGF de ratón es muy similar entre los animales de control, tratados con avastin y tratados con 2C3. Sin embargo, el nivel en el suero de VEGF de ratón es considerablemente mayor en animales tratados con r84. La diferencia en el nivel de VEGF de ratón entre el observado en los animales de control, tratados con avastin y 2C3 y el observado con los animales tratados con r84 es prueba de que los anticuerpos de control, avastin y 2C3 no se unen al VEGF de ratón, mientras que el anticuerpo IgG r84 se une al VEGF de ratón.

La columna "r84" en la figura 24 muestra la cantidad total de VEGF en los sueros (es decir, VEGF libre (biológicamente activo) y VEGF en complejo con r84). Se cree que la cantidad de VEGF libre (biológicamente activo) es un parámetro importante que se va a medir cuando se usan terapéuticamente los anticuerpos dirigidos contra VEGF, en particular para evaluar la efectividad del anticuerpo en la unión al VEGF (Loupakis y col., 2007). La columna "r84 supe" muestra la cantidad de VEGF libre en los sueros después de que se separaran la

inmunoglobulina r84 y r84 unido a VEGF murino por incubación con proteína G. La figura 24 muestra por lo tanto que los niveles de VEGF libre de ratón en el suero de animales tratados con r84 están en niveles base. Por lo tanto, los resultados en la figura 24 no sólo demuestran que r84 se une bien al VEGF de ratón sino que también demuestran que r84 es muy efectivo en la reducción drástica de niveles de VEGF libre (biológicamente activo) en el suero, que es una propiedad importante para usar en terapia.

Los resultados analizados en el ejemplo 11E más adelante, que usa un modelo de tumor mamario de ratón singénico y que muestra que r84 quimérico de ratón mejoraba significativamente la supervivencia de ratones que llevaban tumor, es una validación adicional de que r84 une y bloquea la actividad de VEGF de ratón in vivo.

Los resultados descritos anteriormente, muestran que el anticuerpo r84/PGN311 completamente humano se une tanto al VEGF murino como al VEGF humano, mientras que los anticuerpos 2C3 y Avastin no se unen al VEGF murino. Esto es una ventaja importante en términos de ser capaces de usar r84 para evaluar por ejemplo la actividad antitumoral tanto en modelos singénicos de ratón, es decir, donde se administran células tumorales de ratón a ratones como en modelos de xenoinjerto, es decir, donde se administran células tumorales humanas a ratones.

Además, la capacidad para unirse tanto al VEGF humano como de ratón como se muestra por r84/PGN311 pero no por anticuerpos tales como 2C3 y Avastin, significa que los resultados mostrados por r84 en los modelos de xenoinjerto de ratón es más probable que sean representativos de la actividad de r84 en sujetos humanos, es decir, los resultados con r84 en modelos preclínicos de ratón es probable que sean un buen modelo para lo que se verá cuando el anticuerpo se ponga en pacientes. La razón de esto es que los anticuerpos que sólo pueden unirse a VEGF humano (p. ej., Avastin y 2C3) se unirán al VEGF producido por las células tumorales humanas pero no serán capaces de unirse a VEGF murino endógeno. Por supuesto, esto es diferente de la situación en un paciente humano, en el cual estarían presentes el VEGF producido por el tumor y el VEGF endógeno.

La desventaja potencial con esta situación es que un anticuerpo que se una al VEGF humano pero no al VEGF de ratón puede funcionar bien en un modelo de xenoinjerto de ratón pero esto no se reflejaría por una función similar en un sistema humano donde está presente mucho más VEGF. En otras palabras, el efecto antitumoral visto en un sistema de xenoinjerto de ratón con un anticuerpo que sólo puede unirse al VEGF humano puede parecer mejor que la realidad clínica. En contraste, si se está trabajando con un anticuerpo que se puede unir tanto al VEGF humano como de ratón, entonces este se unirá a todas las formas de VEGF presentes en el sistema de modelo de ratón y es probable que sea mucho más representativo de la situación cuando el anticuerpo se ponga en seres humanos. Ésta es una ventaja importante y una que presentan los anticuerpos de la invención.

35 **Ejemplo 5: Afinidad de unión de EJ173-112-C11 (r84/PGN311)**

Se usó Biacore para evaluar la afinidad de unión de varios anticuerpos. Se hicieron fluir diferentes anticuerpos scFv en una concentración 1 μ M (micromolar) sobre un chip CM5 con VEGF inmovilizado (acoplamiento de amina). En la figura 5 se muestran las curvas de unión, donde se puede ver que la forma scFv de r84/PGN311 tiene una afinidad de unión notablemente mayor que la forma de cadena sencilla del clon madre (m).

Además, se llevaron a cabo estudios iniciales para calcular la afinidad de unión de la IgG r84 por VEGF, en los cuales se hicieron fluir varias concentraciones de IgG r84 sobre VEGF-A inmovilizado. En relación con esto, se calculó la afinidad de unión, expresada como la K_d , usando el modelo de unión 1:1 en el software de Evaluación Biacore 3000. El valor de K_d obtenido para la IgG r84 en este estudio inicial se calculó como $6,7 \times 10^{-9}$ M.

Estudios posteriores de afinidad que usan BiaCore han producido los datos de afinidad mostrados en la tabla 2. Para estos experimentos, se determinó la afinidad de los formatos de IgG de EJ173-112-C11 (r84/PGN311) y 2C3 inmovilizando 100 UR de VEGF-A humano en un chip CM5 (Biacore). Se hizo fluir una serie de diluciones (100 nM y diluciones de 2 veces) de cada IgG sobre la celda de flujo revestida con VEGF con un caudal de 50 μ l/min. Se restó la señal de fondo de una celda de flujo revestida con BSA de las curvas de unión. La afinidad de unión expresada como la K_D se calculó por el modelo de ajuste 1:1 usando el software perteneciente a la máquina Biacore T100.

Tabla 2

KD (M)	VEGF revestido (100 UR), 25°C	VEGF revestido (100 UR), 37°C
2C3	$1,24 \times 10^{-8}$	$3,13 \times 10^{-7}$
r84	$3,21 \times 10^{-9}$	$5,22 \times 10^{-9}$

Los datos muestran que r84 se une a VEGF con afinidad superior que 2C3 tanto a 25°C como a 37°C. Es razonable

esperar que esta diferencia conduzca a características superiores de r84 en comparación con 2C3 en muchos marcos clínicos relacionados con el tratamiento de enfermedades angiogénicas, incluyendo el cáncer. Los resultados a 37°C son particularmente interesantes puesto que ésta es la temperatura a la que se someterán los anticuerpos cuando se usen in vivo. También se debe señalar, que en este experimento, Avastin mostró una pérdida de aproximadamente 10 veces en la afinidad en comparación con la unión a 25°C y 37°C, mientras que r84 es menos sensible a la temperatura (reducción de K_D ni siquiera 2 veces).

Ejemplo 6: Conversión de la forma scFv de r84/PGN311 a las formas de IgG

10 Primero se construyó una forma de IgG completamente humana de r84, como sigue. Las cadenas VH y VL de la forma scFv de la secuencia de anticuerpo r84/PGN311 como se muestra en la figura 1, se tomaron y se insertaron en vectores de expresión kappa y pCon IgG1a de Lonza y después se combinaron para crear un vector que contiene el gen completo del anticuerpo r84. Para hacer el anticuerpo de IgG de longitud completa, después el vector se transfeció en células CHO K1SV.

15 Una vez que se optimizaron las condiciones de crecimiento, la velocidad de producción de la línea celular era de aproximadamente 5 miligramos de anticuerpo por litro de cultivo celular. Aunque este procedimiento de expresión era eficaz, no todo el anticuerpo purificado era estable. Después de la optimización por tampón, se redujo la agregación del anticuerpo, logrando 89,5% de monómero y 10,5% de agregado.

20 Las condiciones optimizadas de crecimiento usadas son Invitrogen CD-CHO con MSX 40 μ M, pH 6,8-7,0, CO₂ al 5%, 37°C. El tampón optimizado usado es fosfato de sodio 10 mM, acetato de sodio 25 mM, glicina 50 mM a pH 5,5.

Con fin de aumentar más la estabilidad de r84/PGN311, se analizó la secuencia de aminoácidos. La comparación de la secuencia r84 con secuencias humanas típicas de anticuerpo indicó que el último aminoácido de la cadena VL de r84 estaba ausente en la construcción que se usa (es decir, el último resto de lisina, K, estaba ausente). Este resto se reintrodujo. También se cambió la secuencia de ADN (sin cambiar la secuencia de aminoácidos traducida) para ser más "compatible" con las células CHO. El resultado era una nueva secuencia de ADN, y una secuencia de aminoácidos donde la cadena VL terminaba en lisina. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las nuevas cadenas pesada y ligera completa del anticuerpo de IgG se muestran a continuación:

Cadena pesada de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTTAGCT
GCAAGGCATCTGGTGGGACATTTTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTTTCGGCAGGCTCCCGGACAG
GGCCTGGAGTGGATGGGGGGGTTTCGATCCCGAAGACGGAGAGACCATTACGCACAGAAGTTTC
AGGGTCGCGTGACCATGACCGAGGATACTTCTACCGACACAGCATATATGGAGCTCAGTAGCTT
GCGCTCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGC GCGGGGTAATC
ATCCCTTTCAACGGGATGGATGTATGGGGCCAAGGGACCACCGTGACAGTCAGCTCTGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCT
GCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGC
AGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCCGAGGGCCTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGA
GAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCC
CTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCTGC
CCCTGACCTAAGGCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCT
CCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
TGCCCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCC
CTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTC
CTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAGGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGC
CCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

(SEQ ID NO:22)

Cadena pesada de IgG de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQ
GRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIIPFNGMDVWGQGTITVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:24)

5

Cadena ligera de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

GACATTCGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTTGAGCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTTACTATCAC
TTGTTCGAGCCTCTCAATCCATCAGCTCCTACTTGAAGTGGTACCAGCAGAAACCCGGGAAAGCA
CCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCTCCTCCCTGCAATCCGGAGTGCCCTCCCGGTTTCAGCGGCTC
CGGCTCTGGAACAGACTTTACCCTGACCATTCTTCTTTGCAGCCTGAGGATTTTGCTACTTACT
ACTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTTGACATTTCGGTGGTGGAAACGAAAGTAGAAATTAAGCG
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGG
CCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA
TAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA
G

(SEQ ID NO:23)

Cadena ligera de IgG de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

DIRMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSP
VTKSFNRGEC

5 (SEQ ID NO:25)

Las nuevas secuencias de ADN de r84/PGN311 mostradas anteriormente se insertaron en vectores de expresión pCon IgG1a y kappa de Lonza y después se combinaron para crear un vector que contiene la secuencia completa del anticuerpo r84/PGN311. El vector después se transfectó con células CHO K1SV. Se aumentó la producción de anticuerpo a más de 350 miligramos por litro con poca optimización de cultivo celular. Lo que es incluso más importante, el anticuerpo era mucho más estable, con monómero de más de 99%.

Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas ligeras variables y pesadas variables de la forma de IgG de r84/PGN311 se muestran a continuación:

15 Cadena VH de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

CAGGTACAGCTTGTGTCAGTCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTTAGCT
GCAAGGCATCTGGTGGGACATTTTCTCCTATGCCATCTCCTGGGTTCGGCAGGCTCCCGGACAG
GGCCTGGAGTGGATGGGGGGGTTTCGATCCCGAAGACGGAGAGACCATTTACGCACAGAAGTTTC
AGGGTCGCGTGACCATGACCGAGGATACTTCTACCGACACAGCATATATGGAGCTCAGTAGCTT
GCGCTCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGCGCGGGGTAATC
ATCCCTTTCAACGGGATGGATGTATGGGGCCAAGGGACCACCGTGACAGTCAGCTCT

(SEQ ID NO:26)

20 Cadena VL de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

GACATTCGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTTGAGCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTTACTATCAC
TTGTTCGAGCCTCTCAATCCATCAGCTCCTACTTGAAGTGGTACCAGCAGAAACCCGGGAAAGCA
CCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCTCCTCCCTGCAATCCGGAGTGCCCTCCCGGTTTCAGCGGCTC
CGGCTCTGGAACAGACTTTACCCTGACCATTCTTCTTTGCAGCCTGAGGATTTTGCTACTTACT
ACTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTTGACATTTCGGTGGTGGAAACGAAAGTAGAAATTAAG

(SEQ ID NO:27)

También se construyó una versión quimérica murina del anticuerpo r84. Esto se realizó para unir la región variable completamente humana a una región constante de ratón, proporcionando un anticuerpo de ratón para usar en algunos estudios preclínicos en ratones. La generación del anticuerpo quimérico murino se realizó como se ha descrito antes para la IgG completamente humana, pero uniendo una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable completamente humana a una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de ratón.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las nuevas cadenas completas pesada y ligera del anticuerpo IgG quimérico, murino se muestran a continuación:

Cadena pesada quimérica de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTGAAGATGGTGAACAATCTACGCACAGAAGTTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
TGAGATCTGAGGACACGCCGTGTATTACTGTGCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCAT
TATACCTTTTAACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCACGCGCCG
ATGCTGCACCGACTGTCTATCCACTGGCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACT
CTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCT
GTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAG
TGACTGTAACTCGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAG
CAGCACCAAGGTGGACAAGAAAGAGCCCAGAGGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAA
TGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGT
ACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
GATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATA

GAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGAT
GAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACC
ATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAG
AGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCAACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTA
CGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTCTGGA
CTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGA
AATAGCTACTCCTGTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTC
CCGACTCCGGGTAAATGA

(SEQ ID NO: 31)

15

Cadena pesada quimérica de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQ
GRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIIPFNGMDVWGQGTITVTVSSRADA
APTYYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTS
STWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSPIVTC
VVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNK
DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWVTNNGKTELNYKN
TEPVLDSGYSFYMSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO: 32)

20 Cadena ligera quimérica de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

GATATCAGGATGACGCAGAGTCCAAGCTCTCTGTCTGCCTCTGTGGGGGACAGGGTGACTATTA
 CTTGTGCGGGCATCACAGAGTATCTCCAGCTACCTTAATTGGTACCAGCAAAAGCCCCGGCAAAGC
 CCCCAAATTGCTGATTTACGCAGCCAGCTCCCTTCAGTCTGGCGTCCCTAGCCGCTTCTCCGGGA
 GCGGATCAGGCACAGACTTTACGTTGACAATCAGTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTTGCCACTTAC
 TACTGTCAACAGAGCTACAGTACGCCTCTCACGTTTGGCGGTGGGACAAAGGTGGAAATCAAAC
 GGGCTGATGCTGCACCGACTGTGTCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT
 GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGA
 TGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACC
 TACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCT
 GTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

(SEQ ID NO: 33)

Cadena ligera quimérica de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

5 DIRMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNPF
 YPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKSTSPIV
 KSFNRNEC

(SEQ ID NO: 34)

Ejemplo 7: EJ173-112-C11 (r84/PGN311) Inhibe efectos mediados por VEGFR2

10 A. r84/PGN311 Inhibe la señalización celular vía VEGFR2

Se usaron ensayos celulares para confirmar el funcionamiento celular del anticuerpo seleccionado. VEGF estimula la
 señalización intracelular a través de la ruta de MAPK quinasa, que también comprende la activación (a través de la
 fosforilación) de dos proteínas llamadas MAPK1 y MAPK2, a 44 y 42 kDa, respectivamente. Otro nombre para estas
 15 proteínas es Erk 1 y Erk2. Los anticuerpos que inhiben la interacción de VEGF con VEGFR2 pueden inhibir también
 la activación de Erk1/2.

Las líneas de células bEnd.3 o PAE/KDR (obtenidas de Dr. Philip Thorpe at UT-Southwestern Medical Center,
 Dallas, TX y Dr. Johannes Waltenberger, Ulm University Medical Center, Ulm, Alemania, respectivamente) expresan
 20 VEGFR2 en su superficie, permitiéndoles ser estimuladas con VEGF. Las líneas celulares se privaron durante 48
 horas de suero y factores de crecimiento, y luego se estimularon por la adición de 10 (V10) y 50 ng/ml de VEGF165
 (V50) en presencia o ausencia del candidato en el formato IgG con 4 µg/ml. Las células no estimuladas eran el
 control negativo (NS). Después de esta estimulación, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo que contenía
 25 diferentes inhibidores de fosfatasa antes de que se lisaran. El extracto celular centrifugado se ejecutó en un gel de
 poliacrilamida, y las proteínas separadas se transfirieron posteriormente a una membrana de nitrocelulosa. La
 transferencia se detectó con un anticuerpo dirigido contra fosfo-Erk1/2 para el seguimiento de la inhibición de la
 fosforilación de Erk1/2 (figura 6). También se detectó Erk1/2 total como un control interno de los niveles celulares. El
 clon de IgG de r84/PGN311 inhibió la fosforilación de Erk1/2.

30 El VEGF también estimula la señalización intracelular a través de la ruta de fosfolipasa Cy (PLC-γ), que implica la
 activación (a través de la fosforilación) de proteína a 155 kD. Los anticuerpos que inhiben la interacción de VEGF
 con VEGFR2 pueden inhibir también la activación de PLC-γ.

Las líneas de células endoteliales microvasculares, dérmicas, humanas (HDMEC, Lonza, catálogo #CC2810)
 35 expresan VEGFR2 en su superficie permitiéndoles ser estimuladas con VEGF. Se pusieron en placa HDMEC con
 250.000 células por pocillo usando placas de 6 pocillos. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche en
 ECM (medio de células endoteliales) con FBS al 5%. Las células después se privaron de suero durante 24 horas y
 se estimularon por la adición de VEGF165 50 ng/ml (+VEGF) en presencia de los anticuerpos Avastin (bevacizumab,
 Presta y col., 1997), r84/PGN311, 2C3 (todos en formato IgG) o un anticuerpo IgG de control (Synagis (palivizumab),

dirigido contra RSV humano, MedImmune). Las IgG se usaron con 90 µg/ml. Las células no estimuladas fueron el control negativo (NT). También se añadieron Avastin y r84/PGN311 a las células en ausencia de VEGF.

Después de esta estimulación, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo que contenía diferentes inhibidores de fosfatasa antes de que se lisaran. El extracto celular centrifugado se ejecutó en un gel de poliacrilamida, y las proteínas separadas posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las transferencias se detectaron con un anticuerpo antifosfo-pERK1/2 (figura 16A, pERK1/2) y anticuerpo dirigido contra fosfo-PLC-γ (figura 16A, pPLC-γ) para hacer el seguimiento de la inhibición de la fosforilación. También se detectaron ERK1/2 total (figura 16A), Erk1/2) y PLC-γ (figura 16A, PLC-γ) como un control interno de los niveles celulares. La expresión de VEGFR2 en las HDMEC se detectó con un anticuerpo contra VEGFR2 (figura 16A). La figura 16A muestra que el anticuerpo IgG r84/PGN311 inhibió la fosforilación tanto de Erk1/2 como PLC-γ.

Usando la misma metodología descrita anteriormente, se trataron células PAE Flt1 que expresan VEGFR1 y se privaron de alimento de la misma manera, antes de que se dejaran sin tratar o que se estimularan mediante la adición de VEGF165 50 ng/ml en presencia o ausencia de los anticuerpos, Avastin o r84/PGN311 (en formato de IgG). Las transferencias se prepararon y se detectaron con un anticuerpo dirigido contra fosfo-VEGFR1 (figura 16B, fosfo-VEGFR1). También se detectó el VEGFR1 total (figura 16B, VEGFR1 total) como un control interno de los niveles celulares. Los datos en la figura 16B muestran que r84/PGN311 no inhibía la fosforilación de VEGFR1, mientras que el control positivo, Avastin, inhibía la fosforilación de VEGFR1. Conjuntamente, la figura 16A y la figura 16B confirman que r84/PGN311 bloquea selectivamente la ruta de VEGFR2.

B. r84/PGN311 bloquea la migración Inducida por VEGF de células que expresan VEGFR2

Como se esperaba, también se confirmó que r84/PGN311 es capaz de inhibir potencialmente la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR2. Los ejemplos de esta actividad se muestran en la figura 20A para HDMEC, y en la figura 20B para células que expresan PAE-KDR. En cada uno de estos ensayos, se señalará que r84 inhibe significativamente la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR2 y se funciona al menos tan bien como Avastin.

Estudios comparativos que usaban células PAE Flt1 que expresan VEGFR1 mostraron que r84 no inhibe la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR1 (figura 21). En cambio, Avastin inhibe significativamente la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR1 (figura 21).

Ejemplo 8: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se une a VEGF121

Se determinó la unión de scFv EJ173/112-C11 (r84/PGN311) a una isoforma biológicamente activa de VEGF-A, VEGF121, (R&D Systems HuVEGF121 298-VS-005/CF). Se pusieron en inmunoplaquetas de poliestireno 2 µg/ml de VEGF121 sin vehículo. Se añadieron 10 µg/ml de scFv purificado y se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el marcador c-myc (Invitrogen) y anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón, secundario, conjugado a HRP.

Los resultados mostraron que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) (figura 7) era positivo para VEGF121. El control scFv murino B9 reconoció VEGF121, pero en un nivel menor que las variantes humanas.

Ejemplo 9: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) bloque la unión del VEGF a VEGFR2 pero no a VEGFR1

Se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos (BD Falcon, n° cat. 353279) durante la noche a 4°C con HuVEGFR1/Fc soluble (R&D Systems, n° cat. 321-FL-050, CF) o HuVEGFR2 (R&D Systems 357-KD-050/CF) en una concentración de 1,0 µg/ml en 50 µl de tampón sensibilizador/pocillo. Los pocillos se lavaron en tampón de lavado (WB) (TBSt (solución salada tamponada con Tris, Tween 20 al 0,1%)) y se bloquearon durante 1 hora a 37°C en Aquablock al 20% (East Coast Biologies, Inc.) en WB. Se añadieron 50 µl de IgG a la concentración adecuada o WB a los pocillos seguido inmediatamente de VEGF-biotina a una concentración final de 100 ng/ml. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavó 3x y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de avidina conjugada con peroxidasa (JacksonImmuno Research) a una dilución 1:7500 en WB. Después del lavado de las placas 4x, se reveló la señal con TMB, se detuvo con ácido y se leyó a 450 nM.

Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 8 A y en la figura 8B. La señal de VEGF solo (VEGF) o VEGF en presencia del anticuerpo indicado se normalizó respecto al VEGF solo (100%). Se muestra la media +/- EEM. N=12 (4 placas idénticas con cada tratamiento realizado por triplicado). Una señal de menos de 50% se

considera inhibición significativa de la unión.

Como se muestra en la figura 8A y en la figura 8B, los resultados de este estudio controlado muestran que r84/PGN311 bloquea sustancialmente la interacción de VEGF con VEGFR2, pero no bloquea sustancialmente la interacción de VEGF con VEGFR1. Estudios paralelos que usaban r84/PGN311 y Avastin (bevacizumab) (Presta y col., 1997) confirmaron las propiedades conocidas de Avastin como que bloquea sustancialmente la interacción de VEGF tanto con VEGFR2 y VEGFR1. Además, los estudios paralelos que usaban r84/PGN311 y el anticuerpo 2C3 murino original mostraron que la diferencia en el bloqueo sustancial de la unión del VEGF a VEGFR2, pero no el bloqueo sustancial de la unión del VEGF a VEGFR1, era incluso mayor para r84 que para 2C3. Esto muestra otra ventaja sorprendente de r84 frente al anticuerpo 2C3.

Ejemplo 10: Macrófagos asociados a tumor expresan VEGFR2

A. Modelo

Se establecieron tumores ortotópicos en ratones sin pelo atímicos (7-9 semanas) inyectando 1×10^6 células MiaPaCa-2 en la cola del páncreas. Se dejó que los tumores se desarrollaron durante una semana antes de iniciar la terapia.

B. Tratamiento

Se trataron animales con anticuerpo de control (C44), o el anticuerpo 2C3 murino por inyección i.p. dos veces por semana durante tres semanas. Cuando se sacrificaron, se extirparon los tumores y con el páncreas residual, se pesaron y se congelaron instantáneamente o se fijaron en solución de metil-Carnoy para análisis histoquímico e inmunohistoquímico.

C. IHC

Los anticuerpos usados para marcadores de macrófago incluyen CD86, CD14 y F4/80. Se usaron los anticuerpos T014 y RAFL-2 de VEGFR2.

D. Aislamiento de macrófagos peritoneales

Se aislaron macrófagos de animales que llevaban tumor (TB) o que no llevaban tumor (NTB) por lavado peritoneal estéril.

E. Resultados

De manera sorprendente, se encontró que los macrófagos asociados a tumor (TAM) expresaban VEGFR2. Esto explica la observación de que 2C3 reducía la infiltración de TAM positivos a VEGFR2 in vivo. Los resultados se muestran en las figuras 10A, B y C.

En relación con esto, la figura 10A representa la colocalización de la tinción de T014 (anticuerpo VEGFR2) y F4/80 (marcador de macrófago) en secciones tumorales de animales tratados con control o tratados con 2C3. 2C3 disminuye la infiltración de macrófagos. Sin embargo, ambos grupos demuestran la colocalización de VEGFR2 y marcadores de macrófago. El número de células doblemente positivas para uno de los tres diferentes marcadores de macrófagos y VEGFR2 se representa en la figura 10B. En la figura 10C, los macrófagos peritoneales de animales que llevaban tumor demuestran VEGFR2 usando dos anticuerpos diferentes.

Ejemplo 11: r84/PGN311 disminuye el volumen tumoral en animales

Se usaron modelos animales para mostrar que la administración del anticuerpo r84/PGN311 conduce a una reducción significativa en los volúmenes tumorales.

A. Modelo de tumor de células de cáncer de mama MDA-MB-231

Se inyectaron 5 millones de células MDA-MB-231 en la almohadilla grasa mamaria de ratones SCID. Los tumores se desarrollaron durante 26 días antes del inicio de la terapia. En este momento, los animales se asignaron al azar a los grupos de tratamiento. Se dieron 100 μ l de solución salina (control, n=5) o 250 μ g en 100 μ l de tampón de IgG

Avastin (n=8) o r84/PGN311 IgG (n=9) por inyección subcutánea 2 veces por semana. Los resultados se muestran en la figura 11, que presenta el volumen tumoral medio $\pm$ EEM. Los ratones tratados con Avastin y r84 tienen volúmenes tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con control. La figura 12 presenta el peso tumoral/peso corporal para animales individuales en cada grupo. Los ratones tratados con Avastin y r84 tienen relaciones de tumor/cuerpo que son significativamente más pequeñas que los animales tratados con control. Los resultados en la figura 11 y en la figura 12 muestran que r84 funcional esencialmente tan eficazmente como Avastin.

B. Modelo de tumor de rhabdomyosarcoma A673

10

Se inyectaron $1,0 \times 10^6$ células A-673 (una línea de células de rhabdomyosarcoma humano ATCC CRL-1598) por vía subcutánea en 22 ratones *nu/nu* (NCI). Los ratones se dividieron en 3 grupos (n=8/grupo para 2C3 y r84/PGN311, n=6/grupo de control) y se inició la terapia 5 días después de la inyección de células tumorales (TCI). La terapia consistía en 50 μ g de la IgG indicada inyectada por vía ip 2x/semana. Se siguieron el volumen tumoral y el peso del animal. El anticuerpo de control era Synagis (antiRSV humano).

15

Los ratones recibieron 8 inyecciones de terapia entre el día 5 y el día 29 después de TCI. La figura 13 muestra el volumen tumoral de cada grupo el día 30 después de TCI. El ANOVA unidireccional indica que los grupos son estadísticamente diferentes; además 2C3 y r84/PGN311 son diferentes del control por "Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett" ($p < 0,05$). Es claro a partir de estos resultados que 2C3 y r84 redujeron el crecimiento tumoral a la dosis modesta de 50 μ g/inyección 2x/semana. r84 presentó actividad que era esencialmente la misma que 2C3. La conclusión general de este estudio animal es que 2C3 y r84 son eficaces en el control del crecimiento de tumores A673.

20

25 C. Modelos de cáncer pulmonar humano de células no pequeñas (NSCLC)

Se usaron además modelos animales in vivo para mostrar que la administración del anticuerpo r84/PGN311 conduce a reducciones significativas en el crecimiento tumoral.

30 Se ensayó la capacidad de r84/PGN311 para inhibir el crecimiento tumoral in vivo en cuatro cánceres pulmonares humanos de células no pequeñas (NSCLC) diferentes, H1299 (ATCC CRL-5803), H460 (ATCC HTB-177), H358 (ATCC CRL-5807) y A549 (ATCC CCL-185). Se inyectaron a ratones SCID (n=25 por línea celular) por vía subcutánea $2,5 \times 10^6$ células, y se inició la terapia 1 día después de TCI. La terapia consistía en 250 μ g de Synagis o XTL (control negativo), IgG de Avastin (control positivo) o 500 μ g de r84/PGN311 suministrado por vía intraperitoneal (i.p.) 2 veces cada semana. La terapia se dio hasta que se sacrificaron los ratones. Los ratones H460 se sacrificaron después de 40 días, los ratones H1299 se sacrificaron después de 48 días, los ratones A549 se sacrificaron después de 55 días, y los ratones H358 se sacrificaron después de 83 días. Se midieron los pesos tumorales, y los resultados se muestran en la figura 17A (para H460), figura 17B (para H1299), figura 17C (para H358) y figura 17D (para A549) como peso tumoral medio $\pm$ EEM. Las relaciones de los pesos tumorales tratados con respecto a los pesos tumorales de control también se muestran en la figura 17A, figura 17B, figura 17C y figura 17D ("T/C").

35

40

La figura 17A, figura 17B, figura 17C y figura 17D muestran que los animales tratados con Avastin y r84/PGN311 tienen pesos tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con control. r84/PGN311 funciona mejor que Avastin en los modelos de H460 (figura 17A), H1299 (figura 17B) y A549 (figura 17D). r84/PGN311 funciona al menos tan eficazmente como Avastin en el ensayo de H358 (figura 17C).

45

D. Modelo de tumor de células de cáncer pancreática Panc1

Ratones que llevaban células de adenocarcinoma pancreático, Panc1, se les dio ya sea IgG r84/PGN311 o Synagis como un control negativo. La terapia se dio hasta que se sacrificaron los ratones. Los volúmenes tumorales se midieron y los resultados se muestran en la figura 22. Se puede ver que r84/PGN311 reduce notablemente el crecimiento tumoral Panc1 en comparación con el control (figura 22).

50

E. Modelo de tumor mamario 4T1

55

Estudios controlados que usan la versión quimérica de ratón de r84/PGN311 mostraron que el anticuerpo r84 es capaz de prolongar la supervivencia de ratones que llevan tumores mamarios 4T1 singénicos. Como se muestra en la figura 23, el tratamiento con r84/PGN311 quimérico de ratón dio como resultado la supervivencia de ratones más tiempo que los animales en el grupo tratado con control.

Ejemplo 12: r84/PGN311 reduce la densidad de microvasos y la infiltración de macrófagos asociados a tumor

Se tomaron tumores de ratones usados en el estudio de modelo de animal de MDA-MB-231 descrito en el ejemplo 11 y también de ratones que se habían tratado en paralelo de acuerdo con el mismo régimen con 250 µg de IgG 2C3 en 100 µl de tampón. Estos tumores se seccionaron y tiñeron con los anticuerpos contra células endoteliales de ratón (MECA-32) y contra un marcador de macrófagos (Mac-3). Se analizaron tres tumores de animales de control y tres tumores cada uno de los animales tratados con r84/PGN311 2C3 y se estudiaron 5 imágenes de cada tumor. Los resultados se muestran en la figura 14 y en la figura 15, que muestran que los tumores de los animales tratados con r84 y 2C3 mostraron un número significativamente reducido de vasos sanguíneos/campo de alta potencia (MECA-32, $p < 0,0001$, figura 15) y expresión significativamente reducida del marcador de macrófagos (Mac-3, $p < 0,01$ para r84, figura 14). Esto es una prueba de que r84 reduce significativamente la densidad de microvasos y la infiltración de macrófagos asociados a tumor y que r84 tiene un efecto más pronunciado que 2C3 en la reducción de la infiltración de macrófagos asociados a tumor (figura 14).

Ejemplo 13: Efectos de r84/PGN311 en células que infiltran tumores**A. Leucocitos polimorfonucleares**

Se tomaron tumores de los ratones usados en el estudio de modelo de animal de MDA-MB-231 descrito en el ejemplo 11 y también de ratones que se habían tratado en paralelo de acuerdo con el mismo régimen con 250 µg de IgG 2C3 en 100 µl de tampón.

El estudio ha mostrado que los tumores de animales tratados con r84 y 2C3 tienen infiltración significativamente mayor de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en comparación con el control. Este efecto fue estadísticamente significativo para los anticuerpos r84 y 2C3. Aunque Avastin (bevacizumab) también aumentó la infiltración de PMN en tumores MDA-MB-231 en comparación con el control, en contraste con r84 y 2C3, este aumento no fue estadísticamente significativo para Avastin.

B. Células CD11b+/Gr1+

Estudios adicionales en ratones que llevaban tumores MDA-MB-231 han mostrado que significativamente menos células doblemente positivas CD11b/Gr1 infiltran los tumores en animales tratados con r84 a diferencia del control. En estudios comparativos, ni el anticuerpo 2C3 ni Avastin mostraron una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+, aunque fue medible alguna reducción en los animales tratados con Avastin.

Se tomaron tumores de los ratones usados en el estudio de modelo de animal de MDA-MB-231 descrito en el ejemplo 11 y también de ratones que se habían tratado en paralelo de acuerdo con el mismo régimen con 250 µg de IgG 2C3 en 100 µl de tampón.

El estudio ha mostrado que significativamente menos células doblemente positivas para CD11b+/Gr1+ infiltran los tumores en animales tratados con r84 a diferencia del control (evaluado por ANOVA, $p < 0,01$, mostrado por ** en la figura 25). La disminución en el número de células doblemente positivas fue de 39%. En estudios comparativos, 2C3 no muestra una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+ (figura 25).

La menor infiltración de células supresoras derivadas de mieloides CD11b+/Gr1+ es de interés especial, puesto que las células que expresan ambos marcadores se han asociado recientemente con la mediación de la capacidad de refracción tumoral a la terapia dirigida contra VEGF (Shojaei y col., 2007). Las células supresoras derivadas de mieloides (CD11b+/Gr1+) también son un contribuyente importante al progreso tumoral. En el microentorno tumoral estas células segregan mediadores inmunosupresores e inducen la disfunción de linfocitos T (Gabrailovich y col., 2001; Serafini y col., 2004).

Puesto que la infiltración tumoral de células CD11b+/Gr1+ es menos pronunciada/significativamente menor en los animales tratados con r84, se sugiere que el tratamiento con r84 es menos propenso al desarrollo de resistencia a fármaco o capacidad de refracción a la terapia dirigida contra VEGF que el tratamiento con otros fármaco que se dirigen al VEGF.

Esta capacidad para reducir la infiltración de células CD11b+/Gr1+ en tumores por lo tanto es una propiedad ventajosa adicional mostrada por el anticuerpo r84/PGN311 y es una propiedad que tiene una importancia potencial

para aplicaciones terapéuticas de r84/PGN311. Además, esta propiedad no la muestra el anticuerpo 2C3 y solo a un nivel más reducido Avastin.

Ejemplo 14: r84/PGN311 reduce la densidad linfática en tumores

5 Ratones con tumores MDAMB-231 se trataron con r84/PGN311 o con el anticuerpo de control y se analizaron secciones tumorales para mostrar los vasos linfáticos dentro de los tumores. Los resultados se presentan en la figura 18A, figura 18B y figura 18C, que muestran que la densidad de vasos linfáticos en tumores tratados con r84 es significativamente menor que en los tumores de control.

10 En particular, se realizó primero la tinción de inmunofluorescencia de secciones tumorales MDA-MB-231 congeladas para identificar vasos linfáticos mediante los marcadores linfáticos, podoplanina y Prox1. Estos resultados se exponen en la figura 18A, que muestra podoplanina (verde), Prox1 (rojo) y las imágenes fusionadas, identificando de este modo los vasos linfáticos en tumores de control (paneles superiores) y tratados con r84 (paneles inferiores).

15 También se realizó la tinción de LYVE-1 en secciones consecutivas de tumores MDA-MB-231. Como se muestra en la figura 18B, estos resultados indican que el patrón de los vasos linfáticos en secciones de tumores MDA-MB-231 teñidas para LYVE-1 es similar al observado para podoplanina y Prox1 (figura 18A).

Para determinar si la densidad de los vasos linfáticos en tumores de control y tratados con r84 era diferente, se examinó el área completa de cada sección tumoral teñida con LYVE-1 con pocos aumentos y se determinó el porcentaje de área positiva para LYVE-1 para cada campo usando el software de formación de imágenes NIS-Elements. Los diez campos con el más con el área de mayor porcentaje positivo para LYVE-1 se promediaron conjuntamente para dar una puntuación final para cada tumor y se ensayó la significación para la media de grupo por una prueba t de Student no apareada. Como se representa en la figura 18C, el porcentaje de área positiva para LYVE-1 de los tumores de control ($7,03 \pm 1,013$; $n = 6$) era significativamente mayor que los tumores tratados con r84 ($2,23 \pm 0,986$; $n = 5$), con $P = 0,0042$. Estos resultados, que muestran que el tratamiento con r84/PGN311 disminuyó significativamente la densidad de vasos linfáticos tumorales, por lo tanto respalda el uso de los anticuerpos humanos de la invención para inhibir la linfangiogénesis.

Ejemplo 15: La administración crónica de r84/PGN311 no induce toxicidad en ratones

En estos estudios se usaron ratones que no llevaban tumor y que llevaban tumor.

Se inyectaron 5×10^6 células Panc-1 (línea de células de cáncer pancreático humano, ATCC CRL-1469), en 10 ratones SCID. El día 1 después de TCI, se inyectó por vía i.p. a 5 ratones que llevaban tumor y 5 ratones que no llevaban tumor 500 μ g de Synagis o IgG r84/PGN311. Se dio la terapia por inyección 2 veces por semana y se continuó durante 12 semanas después de lo cual se sacrificaron los ratones. En el momento del sacrificio, se recogió sangre y se hizo el análisis bioquímico estándar de la sangre. El hígado, riñón y tiroides también se recogieron para evaluación histológica.

40 Estos análisis mostraron que no hubo cambios aparentes en la histología de ningún tejido examinado por tinción de H&E (este examen se llevó a cabo con ocultación por un patólogo especializado en histología de tejido de ratón). Además, se hizo el análisis bioquímico de la sangre para 22 análisis diferentes y no se encontraron cambios significativos entre los ratones de control sin tratamiento previo, o los animales tratados con r84.

45 REFERENCIAS

Abrams and Oldham, "In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer", Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 103-120, 1985.

50 Aiello, Pierce, Foley, Takagi, Chen, Riddle, Ferrara, King, Smith, "Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins," Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:10457-10461, 1995.

Alderson, McGowan, Baldrige, Probst, "TLR4 Agonists as Immunomodulatory Agents", J. Endoxin Res., 12(5):313-319, 2006. Alon, Hemo, Itin, Pe'er, Stone, Keshet, Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity," Nature Med., 1:1024-1028, 1995.

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997.

- Anthony, Wheeler, Elcock, Pickett, Thomas, "Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts", *Placenta*, 15:557-61, 1994.
- Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, Ortiz, Criollo, Mignot, Maiuri, Ullrich, Saulnier, Yang, Amigorena, Ryffel, Barrat, Saftig, Levi, Lidereau, Nogues, Mira, Chompret, Joulin, Clavel-Chapelon, Bourhis, Andre, Delaloge, Tursz, Kroemer, Zitvogel, "Toll-Like Receptor 4-Dependent Contribution of the Immune System to Anticancer Chemotherapy and Radiotherapy", *Nat. Med.*, 13:1050-1059, 2007.
- Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", *FEBS Lett.*, 414:521-526, 1997.
- Asahara, Murohara, Sullivan, Silver, van der Zee, Li, Witzenbichler, Schatteman, Isner, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science*, 275(5302):964-967, 1997.
- Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.
- Asano, Yukita, Matsumoto, Hanatani, Suzuki, "An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity in vivo," *Hybridoma*, 17:185-90, 1998.
- Baca, Presta, O'Connor, Wells, "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.
- Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in *Saccharomyces Cerevisiae*", *EMBO J.*, 6:229-234, 1987.
- Barbas, Kang, Lerner and Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(18):7978-7982, 1991.
- Baxter and Jain, "Transport of fluid and macromolecules in tumors," *Micro. Res.*, 41:5-23, 1991.
- Beckman, Weiner and Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", *Cancer*, 109(2):170-179, 2006-
- Benjamin, Golijanin, Itin, Pode and Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *J. Clin. Invest.*, 103(2):159-165, 1999.
- Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, et al., "Content and organization of the human IgVH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988.
- Borgstrom, Hillan, Sriramara, Ferrara, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.
- Borgstrom Bourdon, Hillan, Sriramara, Ferrara, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.
- Borgstrom, Gold, Hillan, Ferrara, "Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin," *Anticancer Research*, 19(5B):4203-11, 1999.
- Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," *FASEB J*, 6(14):3290-3299, 1992.
- Brekken, Huang, King, Thorpe, "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium," *Cancer Res.*, 58(9):1952-1959, 1998.
- Brekken, Overholser, Stasny, Waltenberger, Minna, Thorpe, "Selective inhibition of VEGFR2 activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice", *Cancer Res.*, 60:5117-24, 2000.

- Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2: 9-20, 1998.
- Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985.
- Burke, Carle, Olson, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", *Science*, 236, 806-812, 1987.
- 10 Burke, Lehmann-Bruinsma, Powell, "Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 207:348-354, 1995.
- Burrows and Thorpe, "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors," *Pharmacol. Ther.*, 64:155-174,1994.
- 15 Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1993.
- Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.
- 20 Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoek, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," *Nature*, 380(6573):435-439, 1996.
- 25 Carillo and Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073,1988.
- Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenue, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.
- 30 Claffey, Brown, del Aguila, Tognazzi, Yeo, Manseau, Dvorak, "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis," *Cancer Res.*, 56:172-181, 1996.
- 35 Clapp, Martial, Guzman, Fentier-Delure, Weiner, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.
- Clauss, Weich, Breier, Knies, Rockl, Waltenberger, Risau, "The vascular endothelial cell growth factor receptor Flt- 1 mediates biological activities," *J. Biol. Chem.*, 271(30):17629-17634,1996.
- 40 Cohen, Gaskins, Nasoff, "Generation of a Monoclonal Antibody Agonist to Toll-Like Receptor 4", *Hybridoma*, 24(1):27-35, 2005.
- 45 Condeelis and Pollard, "Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis", *Cell*, 124:263-266, 2006.
- Connolly, Heuvelman, Nelson, Olander, Eppley, Delfino, Siegel, Leimgruber, Feder, "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 84:1470-1478, 1989.
- 50 Coughlin, Salhany, Wysocka, Aruga, Kurzawa, Chang, Hunter, Fox, Trinchieri, Lee, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.
- 55 Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*", *BioTechnology*, 5:369, 1987.
- D'Amato, Loughnan, Flynn, Folkman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.

- D'Angelo, Struman, Martial, Weiner, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.
- 5 Davies and Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7-12, 1996. Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473, 1990.
- Davies and Riechmann, "Antibody VH domains as small recognition units", *Biotechnology (NY)*, 13:475-479, 1995.
- 10 Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- Detmar, Brown, Claffey, Yeo, Kocher, Jackman, Berse, Dvorak, "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis," *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.
- 15 Devereux, Haeberli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984.
- DeVore, Hellerqvist, Wakefield, Wamil, Thurman, Minton, Sundell, Yan, Carter, Wang, York, Zhang, Johnson, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.
- 20 deVries, Escobedo, Ueno, Houck, Ferrara, Williams, "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor," *Science*, 255(5047):989-991, 1992.
- 25 Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells*, 3:77-85, 1991a.
- Dvorak, Sioussat, Brown, Berse, Nagy, Sotrel, Manseau, Vandewater, Senger, "Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors - concentration in tumor blood vessels," *J. Exp. Med.*, 174:1275-1278, 1991b.
- 30 Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137, 1995.
- 35 Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.
- Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991.
- 40 Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea, Powell-Braxton, Hillan, Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene," *Nature*, 380(6573):439-442, 1996.
- Fidler and Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [comment]," *Cell*, 79(2):185-188, 1994.
- 45 Fidler, Kumar, Bielenberg, Ellis, "Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis," *Cancer J. Sci. Am.*, 4 Suppl 1:S58-66, 1998.
- 50 Finberg, Knipe, Kurt-Jones, "Herpes Simplex Virus and Toll-Like Receptors", *Viral Immunol.*, 18(3):457-465, 2005.
- Folkman and Shing, "Angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934, 1992.
- Folkman, Langer, Linhardt, Haudenschild, Taylor, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983.
- 55 Fong, Rossant, Gertsenstein, Breitman, "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium," *Nature*, 376:66-70, 1995.
- Forsythe, Jiang, Iyer, Agani, Leung, Koos, Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene tran-

- scription by hypoxia-inducible factor 1,"Mol. Cell. Biol., 16:4604-4613, 1996.
- Fotsis, Zhang, Pepper, Adlercreutz, Montesano, Nawroth, Schweigerer, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," Nature, 368(6468):237-239, 1994.
- 5 Frank, Hubner, Breier, Longaker, Greenhalgh, Werner, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," J. Biol. Chem., 270:12607-12613, 1995.
- 10 Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992.
- Frater-Schroder, Risau, Hallmann, Gautschi, Bohlen, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(15):5277-5281, 1987.
- 15 Frazier, "Thrombospondins," Curr. Opin. Cell Biol., 3(5):792-799,1991.
- Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", J. Pept. Sci., 2(4): 212-22, 1996.
- 20 Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. & Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. J Immunol, 166, 5398-406.
- Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," Cancer Res., 52(18):5073-5075, 1992.
- 25 Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," Cancer Res., 53(3):533-535, 1993.
- Gagliardi, Kassack, Kreimeyer, Muller, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," Cancer Chemother. Pharmacol., 41(2):117-124, 1998.
- 30 Gagnon, Bielenberg, Gechtman, Miao, Takashima, Soker, Klagsbrun, "Identification of a natural soluble neuropilin- 1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(6):2573-2578, 2000.
- 35 Gerber, Condorelli, Park, Ferrara, "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes," J. Biol. Chem., 272:23659-23667,1997.
- Gerber, Vu, Ryan, Kowalski, Werb, Ferrara, "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation"; Nature Medicine, 5(6):623-8, 1999.
- 40 Giovarelli, Cappello, Forni, Salcedo, Moore, LeFleur, Nardelli, Di Carlo,Lollini, Ruben, Ullrich, Garotta, Musiam, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", J. Immunol., 164, 3200-3206, 2000.
- 45 Glennie, McBride, Worth, Stevenson, "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments," J. Immunol., 139:2367-2375, 1987.
- Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA,1990.
- 50 Good, Polverini, Rastinejad, Beau, Lemons, Frazier, Bouck, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(17):6624-6628, 1990.
- Goswami, Sahai, Wyckoff, Cammer, Cox, Pizley, Stanley, Segall and Condeelis, "Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop", Cancer Res., 65(12):5278-5283, 2005-
- Grant, Caballero, Bush, Spoerri, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," Diabetes, 47(8):1335-1340, 1998.

- Guo, Jia, Song, Warren, Donner, "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains," *J. Biol. Chem.*, 270:6729-6733, 1995.
- 5 Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature*, 363(6428):446-448, 1993.
- Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature*, 315:680-683, 1985.
- 10 Hanahan and Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, 86(3):353-364, 1996.
- Harada, Mitsuyama, Yoshida, Sakisaka, Taniguchi, Kawaguchi, Ariyoshi, Saiki, Sakamoto, Nagata, Sata, Matsuo, 15 Tanikawa, "Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis", *Scandinavian J. Rheumatol.*, 27(5):377-80, 1998.
- Haran, Maretzek, Goldberg, Horowitz, Degani, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994.
- 20 Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992.
- Harlow and Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, 25 ISBN 978-087969314-5 :1-726, 1988.
- Hellerqvist, Thurman, Page, Wang, Russell, Montgomery, Sundell, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120(1-2):63-70, 1993.
- 30 Henikoff and Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992.
- Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929, 1978.
- 35 Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, Shibuya, "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(16):9349-9354, 1998.
- Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.
- 40 Holash, Maisonpierre, Compton, Boland, Alexander, Zagzag, Yancopoulos, Wiegand, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- Holliger and Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", *Nature Biotechnology*, 23(9): 1126-1136, 2005.
- 45 Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995.
- Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993
- 50 Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998.
- Hood and Granger, "Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(36):23504-23508, 1998.
- 55 Hood, Meininger, Ziche, Granger, "VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells," *Am. J. Physiol.*, 274(3 Pt 2):H1054-1058, 1998.
- Hori, Hu, Yasui, Smither, Gresham, Fan, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.

- Horsmans, Berg, Desager, Mueller, Schott, Fletcher, Steffy, Bauman, Kerr, Averett, "Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection," *Hepatology*, 42(3):724-31, 2005. Houben-weyl, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol.15 I and II, Thieme, Stuttgart, 1987.
- 5 Houck, Ferrara, Winer, Cachianes, Li, Leung, "The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA," *Mol. Endocrinol.*, 5(12):1806-1814, 1991.
- Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.
- 10 Hurwitz, Fehrenbacher, Novotny, Cartwright, Hainsworth, Heim, Berlin, Baron, Griffing, Holmgren, Ferrara, Fyfe, Rogers, Ross, Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer", *N. Engl. J. Med.*, 350:2335-2342, 2004.
- 15 Huse, Sastry, Iverson, Kang, Altling-Mees, Burton, Benkovic and Lerner, "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.
- Hussain, Kotz, Minasian, Premkumar, Sarosy, Reed, Zhai, Steinberg, Raggio, Oliver, Figg, Kohn, "Phase II Trial of Carboxyamidotriazole in Patients With Relapsed Epithelial Ovarian Cancer", *J. Clin. Oncol.*, 21(23):4356-4363, 2003.
- 20 Ingber, Fujita, Kishimoto, Sudo, Kanamaru, Brem, Folkman, "Angiogenesis: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.
- 25 Inoue, Itoh, Ueda, Naruko, Kojima, Komatsu, Doi, Ogawa, Tamura, Takaya, Igaki, Yamashita, Chun, Masatsugu, Becker, Nakao, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", *Circulation*, 98(20):2108-16, 1998.
- 30 Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983.
- Iwamoto, Nomizu, Yamada, Ito, Tanaka, Sugioka, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.
- 35 Jackson, Volpert, Bouck, Linzer, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.
- 40 Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996.
- Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991.
- 45 Kamphaus, Colorado, Panka, Hopfer, Ramchandran, Torre, Maeshima, Mier, Sukhatme, and Kalluri, "Canstatin, a Novel Matrix-derived Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth", *J. Biol. Chem.*, 275(2):1209-1215, 2000.
- Kang, Barbas, Janda, Benkovic and Lerner, "Linkage of Recognition and Replication Functions by Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.
- 50 Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", *EMBO J.*, 6:187-195, 1987.
- 55 Kaur, Brat, Devi and Van Meir, "Vasculostatin, a proteolytic fragment of Brain Angiogenesis Inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor", *Oncogene*, 24:3632-3642, 2005.
- Keck, Hauser, Krivi, Sanzo, Warren, Feder, Connolly, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen

related to PDGF," *Science*, 246:1309-1312,1989.

Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709,1993.

5

Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978,1997.

Kerbel, Vilorio-Petit, Okada, Rak, "Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis," *Mol. Med.*, 4(5):286-295, 1998.

10

Keyt, Nguyen, Berleau, Duarte, Park, Chen, Ferrara, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46,1996.

15

Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.

Kim, Li, Winer, Armanini, Gillett, Phillips, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo," *Nature*, 362:841-844, 1993.

20

Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6,1999.

Kipriyanov, Kupriyanova, Little, Moldenhauer, "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry", *J. Immunol. Meth.*, 196:51-62, 1996.

25

Kipriyanov, Moldenhauer, Little, "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures", *J. Immunol. Meth.*, 200:69-77, 1997.

30

Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.

Kleinman, Weeks, Schnaper, Kibbey, Yamamura, Grant, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.

35

Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 194(3):1234-1241,1993.

Korpelainen and Alitalo, "Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10(2):159-164, 1998.

40

Kremer, Breier, Risau, Plate, "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system," *Cancer Res.*, 57:3852-3859,1997.

45

Kroll and Waltenberger, "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, 272:32521-7,1997.

Kroll and Waltenberger, "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3):743-746, 1998.

50

Kurjan and Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MFa): a Putative α -Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature α -Factor", *Cell*, 30:933-943, 1982.

Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

55

Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23):16736-16745,1992.

- Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4):357-366, 2004.
- 5 Lee, Clapp, Martial, Weiner, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology*, 139(9):3696-3703, 1998.
- Lewis and Pollard, "Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments", *Cancer Res.*, 66(2):605-612, 2006.
- 10 Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998.
- 15 Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(15):8829-34, 1998.
- Lin, Nguyen, Mendoza, Escandon, Fei, Meng, Modi, "Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor", *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 288(1):371-8, 1999.
- 20 Lin, Nguyen, Russell and Pollard, "Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy", *J. Exp. Med.*, 193(6):727-739, 2001.
- 25 Lin, Li, Gnatovskiy, Deng, Zhu, Grzesik, Qian, Xue and Pollard, "Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer", *Cancer Res.*, 66(23):11238-11246, 2006.
- Lindner and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor- induced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.
- 30 Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.
- 35 Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):476-483, 1996.
- Lin-ke, Hong-Qu, Nagy, Eckelhoefer, Masse, Dvorak, Dvorak, "Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor," *Eur. J. Cancer*, 32A(14):2467-2473, 1996.
- 40 Loupakakis, Falcone, Masi, Fioravanti, Kerbel, Del Tacca, Bocci "Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Immunodepleted plasma of Cancer Patients As a Possible Pharmacodynamic Marker for Bevacizumab Activity," *J. Clin. Onc.*, 1816-1818, 2007.
- 45 Luckow and Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170:31-39, 1989.
- Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.
- 50 Luo, Yamaguchi, Shinkai, Shitara, Shibuya, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.
- 55 Majewski, Skopinska, Marczak, Szmurlo, Bollag, Jablonska "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.
- Malecaze, Clamens, Simorre-Pinatel, Mathis, Chollet, Favard, Bayard, Plouet, "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy,"

Arch. Ophthalmol., 112:1476-1482, 1994.

- Maisonpierre, Suri, Jones, Bartunkova, Wiegand, Radziejewski, Compton, McClain, Aldrich, Papadopoulos, Daly, Davis, Sato, Yancopoulos, "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," Science, 5 277(5322):55-60, 1997. Manetti, Cappello, Botta, Corelli, Mongelli, Biasoli, Borgia, Ciomei, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," Bioorg. Med. Chem., 6(7):947-958, 1998.
- Massey, "Catalytic Antibodies Catching On", Nature, 328:457-458, 1987.
- 10 Mazure, Chen, Yeh, Laderoute, Giaccia, "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression," Cancer Res., 56:3436-3440, 1996.
- McNamara, Harmey, Walsh, Redmond, Bouchier-Hayes, "Significance of angiogenesis in cancer therapy [published erratum appears in Br J Surg., Oct;85(10):1449, 1998," Br. J. Surg., 85(8):1044-1055. 1998.
- 15 Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", J. Am. Chem. Assoc., 85:2149-2154, 1964.
- Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," Am. J. Pathol., 153(4):1249-1256, 1998.
- 20 Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo," Cancer Res., 56:1615-1620, 1996-
- 25 Mills, Brooker and Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," Nucl. Acids Res., 18:7305-7316, 1990.
- Moore, Arenberg, Addison, Keane, Streiter, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," J. Lab. Clin. Med., 132(2):97-103, 1998.
- 30 Mordenti, Thomsen, Licko, Chen, Meng, Ferrara, "Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans", Toxicologic Pathology, 27(1):14-21, 1999.
- Morrison, Wims, Kobrin and Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," Mt. Sinai J. Med., 53(3):175, 1986.
- 35 Muller, Li, Christinger, Wells, Cunningham, De Vos, "Vascular Endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94:7192-7197, 1997.
- 40 Muller, Chen, Christinger, Li, Cunningham, Lowman, de Vos, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," Structure, 6(9):1153-67, 1998.
- Mustonen and Alitalo, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis," J. Cell Biol., 129:895-898, 45 1995.
- Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", CABIOS, 4:11-17, 1988.
- Nagashima, Yoshino, Aono, Takai, Sasano, "Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells", Clin. Exp. Immunol., 116(2):360-5, 1999.
- 50 Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis in vivo by linomide," Connect Tissue Res., 37(1-2):61-68, 1998.
- 55 Nakamura Voller and Bidwell, "Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems", In: Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1: Immunochemistry, D.M. Weir (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1986, Chapter 27.
- Needleman and Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of

- Two Proteins", J. Mol. Biol., 48:443, 1970.
- Neuberger and Milstein, "Somatic hypermutation," Curr. Opin. Immunol., 7:248-254, 1995.
- 5 Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," FASEB J., 13(1):9-22, 1999.
- Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", Protein Sci.,13:1882-1891,2004.
- 10 Niida, Kaku, Amano, Yoshida, Kataoka, Nishikawa, Tanne, Maeda, Nishikawa, Kodama, "Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption", J. Exp. Med., 190(2):293-8, 1999.
- 15 Nozaki, Sakurai, Raisler, Baffi, Witta, Ogura, Brekken, Sage, Ambati, Ambati, "Loss of SPARC-mediated VEGFR- 1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A", J. Clin. Invest., 116(2):422-9, 2006.
- Oikawa, Hirotani, Nakamura, Shudo, Hiragun, Iwaguchi, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," Cancer Lett., 48(2):157-162, 1989.
- 20 Olander, Connolly, DeLarco, "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells," Biochem. Biophys. Res. Comm., 175:68-76,1991.
- O'Reilly, Holmgren, Shing, Chen, Rosenthal, Moses, Lane, Cao, Sage, Folkman "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," Cell, 79:315-328, 1994.
- 25 O'Reilly, Boehm, Shing, Fukai, Vasios, Lane, Flynn, Birkhead, Olsen, Folkman "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," Cell, 88(2):277-285, 1997.
- 30 Palmiter and Brinster, "Transgenic Mice", Cell, 41:343-345, 1985.
- Palmiter, Norstedt, Gelinas, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", Science, 222:809-814, 1983.
- 35 Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," Gene, 73(2):305-318, 1988.
- Pearson and Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988.
- 40 Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology, 183:63-98, 1990.
- Pepper, Ferrara, Orci, Montesano, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis in vitro," J. Cell Sci., 45 108(1):73-83, 1995.
- Petersen, Wang, Yalcin-Chin, Li, Peyton, Minna, Harran, Wang, "Autocrine TNFa Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis", Cancer Cell, 12(5):445-456, 2007.
- 50 Petrova, Nykanen, Norrmén, Ivanov, Andersson, Haglund, Puolakkainen, Wempe, von Melchner, Gradwohl, Vanharanta, Aaltonen, Saharinen, Gentile, Clarke, Taipale, Oliver, Alitalo, "Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype", Cancer Cell, 13(5):407-19, 2008.
- 55 Pike, Yao, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta and Tosato, "Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth", J. Exp. Med., 188(12):2349-2356, 1998.
- Pike, Yao, Setsuda, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Atreya, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta and

- Tosato, "Calreticulin and Calreticulin Fragments Are Endothelial Cell Inhibitors That Suppress Tumor Growth", *Blood*, 94(7):2461-2468, 1999.
- Plate, Breier, Weich, Mennel, Risau, "Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms," *Int. J. Cancer*, 59:520-529, 1994.
- Potgens, Westphal, DeWaal, Ruiter, "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis," In: *Growth Factors in Tumor Angiogenesis*, Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp. 57-70, 1995.
- Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997.
- Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929, 2007
- Quinn, Thurman, Sundell, Zhang, Hellerqvist, "CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.
- Raychaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*, 47(3):224-229, 1991.
- Reff and Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 40:25-35, 2001.
- Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee and Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnology*, 14:1239-1245, 1996.
- Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science*, 245:175-177, 1989.
- Ryan, Eppler, Hagler, Bruner, Thomford, Hall, Shopp, O'Neill, "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody", *Toxicologic Pathology*, 27(1):78-86, 1999.
- Sakamoto, Tanaka, Togho, Ogawa, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.
- Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.*, 56:393-401, 1996.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998.
- Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", *Gene*, 54:113-123, 1987.
- Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", *Nature*, 329:840, 1987.
- Senger, Galli, Dvorak, Perruzzi, Harvey, Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," *Science*, 219:983-985, 1983.
- Senger, Perruzzi, Feder, Dvorak, "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines," *Cancer Res.*, 46:5629-5632, 1986.
- Senger, Connolly, Vandewater, Feder, Dvorak, "Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig

tumor secreted vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 50:1774-1778,1990.

Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P. & Bronte, V. (2004). "Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells", *Cancer Immunol Immunother*, 53, 64-72.

Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice," *Nature*, 376:62-66, 1995.

Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.

Sheu, Yen, Kan, "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha(v)\beta_3$ integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997.

Shibuya, "Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1):a dual regulator for angiogenesis", *Angiogenesis*, 9(4):225-30, 2007.

Shojaei, Wu, Malik, Zhong, Baldwin, Schanz, Fuh, Gerber, Ferrara, "Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells", *Nature Biotechnology*, 25:911-920, 2007.

Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, et al., "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989.

Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998.

Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Biosci (Bangalore)*, 11:47-58,1987.

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.

Sipos, Tamargo, Weingart, Brem, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NYAcad. Sci.*, 732:263-272,1994.

Smith and Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.

Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With Baculovirus Expression Vector", *Mol. Cell Biol.*, 3:2156-2165, 1983.

Soff, Sanderowitz, Gately, Verrusio, Weiss, Brem, Kwaan, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.

Soker, Takashima, Miao, Neufeld, Klagsbrun., "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform- specific receptor for vascular endothelial growth factor," *Cell*, 92(6):735-745, 1998.

Springer, Chen, Kraft, Bednarski, Blau, "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults," *Mol. Cell*, 2(5):549-558, 1998.

Stella and Himmelstein, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", *Directed Drug Delivery*, Borchartt et al., Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Sweetwyne, Brekken, Workman, Bradshaw, Carbon, Siadak, Murri and Sage, "Functional Analysis of the Matricellular Protein SPARC with Novel Monoclonal Antibodies", *J. Histochem. Cytochem.*, 52(6):723-733, 2004.

Tada, Fukunaga, Wakabayashi, Masumi, Sato, Izumi, Kohno, Kuwano, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.

- Takano, Gately, Neville, Herblin, Gross, Engelhard, Perricone, Eidsvoog, Brem, "Suramin, an anticancer and angi-suppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.*, 54(10):2654-2660, 1994.
- 5 Tanaka, Manome, Wen, Kufe, Fine, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.
- Terman, Dougher-Vermazen, Carrion, Dimitrov, Armellino, Gospodarowicz, Bohlen, "Identification of the KDR tyro-
10 sine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187:1579-1586, 1992.
- Terman, Khandke, Dougher-Vermazan, Maglione, Lassam, Gospodarowicz, Persico, Bohlen, Eisinger, "VEGF re-
15 ceptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor," *Growth Factors*, 11(3):187-195, 1994.
- Thomas, "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent," *J. Biol. Chem.*, 271:603-606, 1996.
- 20 Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.
- Thorpe, Derbyshire, Andrade, Press, Knowles, King, Watson, Yang, Rao-Bette, "Heparin-Steroid Conjugates: New
25 Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.
- Tischer, Mitchell, Hartman, Silva, Gospodarowicz, Fiddes, Abraham, "The human gene for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954, 1991.
- 30 Tolsma, Volpert, Good, Frazier, Polverini, Bouck, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.
- Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.
- 35 Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonnier, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.
- van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and
40 B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.*, 310:591-601, 2001.
- van dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren and Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.
- 45 Varfolomeev, Blankenship, Wayson, Fedorova, Kayagaki, Garg, Zobel, Dynek, Elliott, Wallweber, Flygare, Fairbrother, Deshayes, Dixit, Vucic, "IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF-kB Activation, and TNFa-Dependent Apoptosis", *Cell*, 131(4):669-681, 2007.
- 50 Vince, Wong, Khan, Feltham, Chau, Ahmed, Benetatos, Chunduru, Condon, McKinlay, Brink, Leverkus, Tergaonkar, Schneider, Callus, Koentgen, Vaux, Silke, "IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNFa-Dependent Apoptosis", *Cell*, 131(4):682-693, 2007.
- Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental
55 metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.
- Vukanovic, Passaniti, Hirata, Traystman, Hartley-Asp, Isaacs, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.

- Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature*, 376:732, 1995.
- Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, Heldin, "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 269(43):26988-26995, 1994.
- 5 Waltenberger, Mayr, Pentz, Hombach, "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia," *Circulation*, 94:1647-1654, 1996.
- Waltenberger, Mayr, Frank, Hombach, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996.
- 10 Wamil, Thurman, Sundell, DeVore, Wakefield, Johnson, Wang, Hellervist, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.
- 15 Ward, Gussow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia Coli*", *Nature*, 341(6242):544-546, 1989.
- Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.
- 20 Whitehurst, Flister, Bagaitkar, Volk, Bivens, Pickett, Castro-Rivera, Brekken, Gerard, Ran, "Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model", *Int. J. Cancer*, 121(10):2181-91, 2007.
- 25 Wiesmann, Fuh, Christinger, Eigenbrot, Wells, de Vos, "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.
- Willman et al., "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.
- 30 Winter and Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Wolff, Guerin, Lartera, Bressler, Indurtti, Brem, Goldstein, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.
- 35 Wyckoff, Wang, Lin, Wang, Pixley, Stanley, Graf, Pollard, Segall and Condeelis, "A Paracrine Loop Between Tumor Cells and Macrophages is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors", *Cancer Res.*, 64:7022-7029, 2004.
- Xie, Chen, Fu, Harter, Young, Sunkara, Novak, Villanueva-Siles, Ratech, "Podoplanin (d2-40): a new immunohistochemical marker for reactive follicular dendritic cells and follicular dendritic cell sarcomas", *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 1(3):276-84, 2008.
- 40 Yoon, Yoo, Choi, Do, Kang, Lee, Azuma, Kim, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non- haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett*, 97(1):83-91, 1995.
- 45 Yoshida, Kaneko, Tsukamoto, Han, Ichinose, Kimura, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.
- 50 Young, MacKenzie, Narang, Oomen and Baenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995.
- Yamamura, Kibbey, Jun, Kleinman, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993.
- 55 Zachary, "Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal," *Exp. Nephrol.*, 6(6):480-487, 1998.
- Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.

Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')₂ Fragments For Efficient Production in Escherichia Coli and Enhanced Antiproliferative Activity", Protein Eng., 8(10):1057-1062,1995.

- 5 Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", Science, 303(5656): 371-373, 2004.

Ziche, Donnini, Morbidelli, Parenti, Gasparini, Ledda, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," Br. J. Cancer, 77(7):1123-1129, 1998.

- 10 Zou, Anisowicz, Hendrix, Thor, Neveu, Sheng, Rafidi, Seftor, Sager, "Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells", Science, 28:263(5146):526-9, 1994.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Affitech AS
Peregrine Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Composiciones de anticuerpos dirigidos contra VEGF y procedimientos
- 20 <130> 69.93964/03
- <150> US 60/987,015,
<151> 2007-11-09
- 25 <150> US 61/108,023,
<151> 2008-10-24
- <150> US 61/106,047,
30 <151> 2008-10-16
- <160> 34
- <170> PatentIn version 3.3
- 35 <210> 1
<211> 378
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 40 <220>
<223> dominio VH de anticuerpo
- <400> 1
- 45

```

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggt ttgatcctg aagatggtga aacaatctac      180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggacgt      300
tctatggttc ggggagtcac tatacctttt aacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc      360
acggtcaccg tctcctca                                     378

```

<210> 2
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> dominio VL de anticuerpo
 10 <400> 2

gacatccgga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 3
 15 <211> 126
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 20 <223>dominio VH de anticuerpo

 <400> 3

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

<210> 4

<211> 107

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> dominio VL de anticuerpo

10

<400> 4

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 5

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 VH de anticuerpo

10

<400> 5

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

15

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> CDR2 VH de anticuerpo

<400> 6

25

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 17

30 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 VH de anticuerpo

35

<400> 7

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 11

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 VL de anticuerpo

10

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

15 <210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR2 VL de anticuerpo

<400> 9

Ala Ala Ser Ser Leu Gln ser
1 5

25

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 VL de anticuerpo

35 <400> 10

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 11

40 <211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> FR1 VH de anticuerpo

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 12

<211> 14

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> FR2 VH de anticuerpo

10

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

15 <210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> FR3 VH de anticuerpo

<400> 13

Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

25

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220>

<223> FR4 VH de anticuerpo

35 <400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15

40 <211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> FR1 VL de anticuerpo

5 <400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 16

10 <211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> FR2 VL de anticuerpo

<400> 16

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

20

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> FR3 VL de anticuerpo

<400> 17

30

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

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

<210> 18

<211> 10

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> FR4 VL de anticuerpo

40

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 21
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> ligador

10
<400> 19

Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
1 5 10 15

Ser Glu Ala Arg Val
20

15 <210> 20
<211> 762
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> clon scFv completo
<400> 20

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggagg	caccttcagc	agctatgcta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaggt	tttgatcctg	aagatgggtga	aacaatctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctacaga	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aacaggacgt	300
tctatgggtc	ggggagtcac	tatacctttt	aacgggtatg	acgtctgggg	ccaagggacc	360
acgggtcaccg	tctcctcaaa	gcttttcaggg	agtgcacccg	ccccaaaact	tgaagaagggt	420
gaattttcag	aagcacgcgt	agacatccgg	atgacccagt	ctccatcctc	cctgtctgca	480
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	cgggcaagtc	agagcattag	cagctattta	540
aattgggtatc	agcagaaaacc	agggaaagcc	cctaagctcc	tgatctatgc	tgcatccagt	600
ttgcaaagtg	gggtcccatc	aagggttcagt	ggcagtggtg	ctgggacaga	tttcactctc	660
accatcagca	gtctgcaacc	tgaagatttt	gcaacttact	actgtcaaca	gagttacagt	720
accccgctca	ctttcggcgg	agggaccaag	gtggagatca	aa		762

25

<210> 21
<211> 254
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> clon scFv completo

<400> 21

10

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

<210> 22
 <211> 1977
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <210> 23
 <220>
 <223> cadena pesada de IgG

10 <400> 22

cagggtacagc	ttgtgcagtc	cggagccgag	gtgaagaaac	ccggagcatc	agtgaagggtt	60
agctgcaagg	catctggtgg	gacattttcc	tcctatgcca	tctcctgggt	tcggcaggct	120
cccggacagg	gcctggagtg	gatggggggg	ttcgatcccc	aagacggaga	gaccatttac	180
gcacagaagt	ttcagggtcg	cgtgaccatg	accgaggata	cttctaccga	cacagcatat	240
atggagctca	gtagcttgcg	ctccgaggac	acggctgtat	attactgtgc	cactggacgg	300
agcatggtgc	gcggggtaat	catccctttc	aacgggatgg	atgtatgggg	ccaagggacc	360
accgtgacag	tcagctctgc	ctccaccaag	ggcccatcgg	tcttccccct	ggcaccctcc	420
tccaagagca	cctctggggg	cacagcggcc	ctgggctgcc	tgggtcaagga	ctacttcccc	480
gaaccggtga	cggtgtcgtg	gaactcaggc	gccctgacca	gcggcgtgca	caccttcccc	540
gctgtcctac	agtcctcagg	actctactcc	ctcagcagcg	tggtgaccgt	gccctccagc	600
agcttgggca	cccagaccta	catctgcaac	gtgaatcaca	agcccagcaa	caccaagggtg	660
gacaagaaag	ttggtgagag	gccagcacag	ggagggaggg	tgtctgctgg	aagccaggct	720
cagcgtcct	gcctggacgc	atcccggcta	tgcagcccca	gtccagggca	gcaaggcagg	780
ccccgtctgc	ctcttcaccc	ggaggcctct	gcccgcacca	ctcatgctca	gggagaggggt	840
cttctggctt	tttccccagg	ctctgggcag	gcacaggcta	gggtgccccta	accaggccc	900
tgacacaaaa	ggggcagggtg	ctgggctcag	acctgccaa	agccatatcc	gggaggaccc	960
tgcccctgac	ctaagcccac	cccaaaggcc	aaactctcca	ctccctcagc	tcggacacct	1020
tctctcctcc	cagattccag	taactcccaa	tcttctctct	gcagagccca	aatcttgtga	1080
caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccagg	taagccagcc	caggcctcgc	cctccagctc	1140
aaggcgggac	aggtgcccta	gagtagcctg	catccaggga	caggccccag	ccgggtgctg	1200

acacgtccac	ctccatctct	tcctcagcac	ctgaactcct	ggggggaccg	tcagtcttcc	1260
tcttcccccc	aaaaccaag	gacaccctca	tgatctcccg	gaccctgag	gtcacatgcg	1320
tgggtggtgga	cgtgagccac	gaagaccctg	aggtcaagtt	caactggtac	gtggacggcg	1380
tggagggtgca	taatgccaag	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	acgtaccgtg	1440
tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	tacaagtgca	1500
aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccc	tcgagaaaac	catctccaaa	gccaaagggtg	1560
ggaccctggtg	ggtgagggg	ccacatggac	agaggccggc	tcggcccacc	ctctgcccctg	1620
agagtgaccg	ctgtaccaac	ctctgtccct	acagggcagc	cccgagaacc	acagggtgtac	1680
accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctgggtc	1740
aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	1800
aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttctc	ctacagcaag	1860
ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	1920
gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaatag	1977

<210> 23

<211> 645

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de IgG

10

<400> 23

gacattcgga	tgactcagtc	tccctcctct	ttgagcgctt	ctgtgggcga	tagggttact	60
atcacttgtc	gagcctctca	atccatcagc	tcctacttga	actggtacca	gcagaaaccc	120
gggaaagcac	ccaagctgct	tatttacgcc	gcctcctccc	tgcaatccgg	agtgccctcc	180
cggttcagcg	gctccggctc	tggaaacagac	tttaccctga	ccatttcttc	tttgacgcct	240
gaggattttg	ctacttacta	ctgtcagcag	agttactcca	cccccttgac	attcggtggt	300
ggaacgaaa	tagaaattaa	gcgtacgggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcc	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttag		645

<210> 24
<211> 456
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> cadena pesada de IgG

<400> 24

10

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

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 25

<211> 214

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de IgG

10

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

<210> 26

<211> 378

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> dominio VH de IgG

10

<400> 26

cagggtacagc ttgtgcagtc cggagccgag gtgaagaaac ccggagcatc agtgaagggt 60
agctgcaagg catctggtgg gacattttcc tcctatgcc a tctcctgggt tcggcagggt 120
cccggacagg gcctggagtg gatggggggg ttcgatcccg aagacggaga gaccatttac 180
gcacagaagt ttcagggtcg cgtgaccatg accgaggata cttctaccga cacagcatat 240
atggagctca gtagcttgcg ctccgaggac acggctgtat attactgtgc cactggacgg 300
agcatgggtgc gcggggtaat catccctttc aacgggatgg atgtatgggg ccaagggacc 360

accgtgacag tcagctct 378

<210> 27
<211> 321
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> dominio VL de IgG

10 <400> 27

gacattcgga tgactcagtc tccctcctct ttgagcgctt ctgtgggcga tagggttact 60
atcacttgtc gagcctctca atccatcagc tcctacttga actggtacca gcagaaaccc 120
gggaaagcac ccaagctgct tatttacgcc gcctcctccc tgcaatccgg agtgccttcc 180
cggttcagcg gctccggctc tggaacagac tttaccctga ccatttcttc ttgacgcct 240
gaggattttg ctacttacta ctgtcagcag agttactcca cccctttgac attcgggtgg 300
ggaacgaaag tagaaattaa g 321

15 <210> 28
<211> 78
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> marcador c-myc y His

<400> 28

gcggccgctg gatccgaaca aaagctgatc tcagaagaag acctaaactc acatcaccat 60
caccatcact aatctaga 78

25

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
30 <213> secuencia artificial

<220>

<223> marcador c-myc y His

<220>

5 <221> marcador de epítipo c-myc

<222> (6)..(15)

<220>

<221> marcador de epítipo His

10 <222> (18)..(23)

<400> 29

Ala Ala Ala Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10 15

Ser His His His His His His
20

15

<210> 30

<211> 778

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> clon scFv completo inclusive sitios de restricción NcoI y NotI

<400> 30

25

```
ccatggccca ggtgcagctg gtgcaatctg gggctgaggt gaagaagcct ggggcctcag      60
tgaaggctct ctgcaaggct tctggaggca ccttcagcag ctatgctatc agctgggtgc      120
gacaggcccc tggacaaggg cttgagtggg tgggaggttt tgatcctgaa gatggtgaaa      180
caatctacgc acagaagttc cagggcagag tcacatgac cgaggacaca tctacagaca      240
cagcctacat ggagctgagc agcctgagat ctgaggacac ggccgtgtat tactgtgcaa      300
caggacgttc tatggttcgg ggagtcatta taccttttaa cggtatggac gtctggggcc      360
aagggaccac ggtcacctgc tcctcaaagc tttcagggag tgcacccgcc ccaaaacttg      420
aagaagggtga attttcagaa gcacgcgtag acatccggat gacccagtct ccacctccc      480
tgtctgcac tgtaggagac agagtcacca tcaacttgccg ggcaagtcag agcattagca      540
gctatttaaa ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg atctatgctg      600
catccagttt gcaaagtggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct gggacagatt      660
tcaacttcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac tgtcaacaga      720
gttacagtac cccgctcact ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa gcggccgc      778
```

<210> 31

<211> 1368

30 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada quimérica

5

<400> 31

```

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtg aacaatctac      180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggacgt      300
tctatggttc ggggagtcac tatacctttt aacggatggt acgtctgggg ccaagggacc      360
acggtcaccg tctcctcacg cgccgatgct gcaccgactg tctatccact ggccccctgtg      420
tgtggagata caactggctc ctcggtgact ctaggatgcc tggtaagggt ttatttcctt      480
gagccagtga ccttgacctg gaactctgga tccctgtcca gtgggtgtgca caccttccca      540
gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc      600
tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg gccaccccgg caagcagcac caaggtggac      660
aagaaagagc ccagagggcc cacaatcaag ccctgtcctc catgcaaagc cccagcacct      720

```

```

aacctcttgg gtggaccatc cgtcttcacg ttccctccaa agatcaagga tgtactcatg      780
atctccctga gccccatagt cacatgtgtg gtgggtggatg tgagcgagga tgaccagat      840
gtccagatca gctgggttgt gaacaacgtg gaagtacaca cagctcagac acaaaccat      900
agagaggatt acaacagtac tctccgggtg gtcagtgtcc tccccatcca gcaccaggac      960
tggatgagtg gcaaggagtt caaatgcaag gtcaacaaca aagacctccc agcgcccatc     1020
gagagaacca tctcaaaacc caaaggggtc gtaagagctc cacagggtata tgtcttgccct     1080
ccaccagaag aagagatgac taagaaacag gtcactctga cctgcatggt cacagacttc     1140
atgcctgaag acattttacgt ggagtggacc aacaacggga aaacagagct aaactacaag     1200
aacactgaac cagtccttga ctctgatggt tcttacttca tgtacagcaa gctgagagtg     1260
gaaaagaaga actgggttga aagaaatagc tactcctgtt cagtgggtcca cgaggggtctg     1320
cacaatcacc acacgactaa gagcttctcc cggactccgg gtaaatga                    1368

```

10 <210> 32

<211> 455

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> cadena pesada quimérica

<400> 32

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

Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser
 180 185 190
 Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys
 195 200 205
 Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Glu Pro
 210 215 220
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
 245 250 255
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
 275 280 285
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
 340 345 350
 Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 370 375 380
 Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
420 425 430
Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
435 440 445
Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455

<210> 33
<211> 642
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera quimérica

<400> 33

gatatcagga tgacgcagag tccaagctct ctgtctgcct ctgtggggga cagggtgact	60
attacttgtc gggcatcaca gagtatctcc agctacctta attggtacca gcaaaagccc	120
ggcaaagccc ccaaattgct gatttacgca gccagctccc ttcagtctgg cgtccctagc	180
cgcttctccg ggagcggatc aggcacagac ttctacgttga caatcagttc tctgcagccg	240
gaggattttg ccacttacta ctgtcaacag agctacagta cgcctctcac gtttggcgggt	300
gggacaaagg tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccga ctgtgtccat cttcccacca	360
tccagttagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac	420
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg	480
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg	540
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca	600
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt	642

15 <210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> cadena ligera quimérica

<400> 34

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une al VEGF y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, donde
5 dicha región variable de cadena ligera comprende:
 - (a) una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,
 - 10 (b) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y
 - (c) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y
15 donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:
 - (d) una CDR1 de cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,
20
 - (e) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y
 - (f) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente
25 homóloga a la misma,

donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos comparado con la secuencia de CDR dada; y donde dicho anticuerpo aislado que tiene dicha secuencia sustancialmente homóloga
30
 - (i) se une al menos al VEGF humano y al VEGF de ratón,
 - (ii) inhibe significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión del VEGF al receptor del VEGF VEGFR1 (Flt1), y
35
 - (iii) retiene la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo del VEGF que el reconocido por un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una CDR1 de la cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
40
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una CDR1 de la cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
45
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde dicha región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma, y/o donde dicha región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma.
50
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde dicha región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y dicha región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
55
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho anticuerpo comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo entero que comprende una región constante de anticuerpo, preferiblemente dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG, más preferiblemente dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma.

8. El anticuerpo de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, preferiblemente dicho fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, Fd, DAB, dímero de TandAb, anticuerpo lineal, minianticuerpo, dianticuerpo o fragmento biespecífico de anticuerpo.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho anticuerpo está unido a al menos un primer agente de diagnóstico o terapéutico, preferiblemente dicho anticuerpo está unido a al menos un primer agente radioterapéutico, agente quimioterapéutico, agente antiangiogénico, agente inductor de apoptosis, fármaco antitubulina, agente anticelular o citotóxico, esteroide, citoquina, quimioquina o coagulante, u opcionalmente dicho anticuerpo está unido a:

- (a) un radioisótopo de arsénico;
- (b) taxol, docetaxel, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, una combretastatina, doxorubicina o adriamicina;
- (c) una toxina ricina, gelonina, abrina, differia, pseudomonas o pertussis;
- (d) un inhibidor de ATPasa tipo V;
- (e) IL-2, IL-12, TNF- α , un interferón o LEC; o
- (f) factor tisular truncado.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión por el VEGF que corresponde a una K_d menor de 10 nM cuando dicho anticuerpo está en formato de IgG.

12. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, unido a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico.

13. Una composición que comprende al menos un primer anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o un inmunoconjugado del mismo, preferiblemente dicha composición es una composición farmacéuticamente aceptable y opcionalmente dicha composición o composición farmacéuticamente aceptable comprende además al menos un segundo agente terapéutico.

14. La composición de la reivindicación 13, donde dicho al menos un segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

15. La composición de la reivindicación 14, donde dicho al menos un segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en análogos de pirimidina, complejos de coordinación de platino y camptotecinas.

16. La composición de la reivindicación 15, donde dicho al menos un segundo agente terapéutico es 5-fluorouracilo, oxaliplatino, cisplatino o irinotecán.

17. Una molécula de ácido nucleico que comprende una región de secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, preferiblemente

(i) dicha región de secuencia de nucleótidos codifica un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma, donde preferiblemente dicha región de secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20, o

5 (ii) dicha región de secuencia de nucleótidos codifica una anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma, donde preferiblemente dicha región de secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:24 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 y donde dicha región
10 de secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:25 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23.

18. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17.

19. Una célula hospedante o virus que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17 o
15 el vector de expresión de la reivindicación 18.

20. Un kit que comprende, en al menos un primer envase:

- (a) el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- 20 (b) el inmunoconjugado de la reivindicación 12;
- (c) la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16;
- (d) la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17;
- (e) el vector de expresión de la reivindicación 18; o
- 25 (f) la célula hospedante o virus de la reivindicación 19.

21. Un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende:

- (a) cultivar una célula hospedante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 18 en condiciones
30 eficaces para expresar el anticuerpo codificado; y
- (b) obtener el anticuerpo expresado de dicha célula hospedante.

22. Un procedimiento de unión del VEGF, que comprende poner en contacto una composición que comprende VEGF con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un inmunoconjugado del mismo.
35

23. Un procedimiento de detección del VEGF, que comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener VEGF con el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un inmunoconjugado del mismo, en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo y para detectar los complejos así formados.
40

24. Un procedimiento de diagnóstico in vitro de una enfermedad angiogénica o una enfermedad linfangiogénica en un animal, que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho animal con el anticuerpo de una cualquiera de las
45 reivindicaciones 1 a 11, o un inmunoconjugado del mismo, en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo;
- (b) detectar los complejos de VEGF/anticuerpo así formados, determinando así la cantidad de VEGF en dicha muestra de ensayo; y
- (c) comparar la cantidad de VEGF en dicha muestra de ensayo con la cantidad de VEGF en una muestra de control
50 correspondiente, donde una mayor cantidad de VEGF en dicha muestra de ensayo con respecto a la cantidad de VEGF en dicha muestra de control es indicativa de una enfermedad angiogénica o una enfermedad linfangiogénica.

25. El procedimiento de la reivindicación 24, donde dicha enfermedad angiogénica o enfermedad linfangiogénica es cáncer, enfermedad neovascular ocular, degeneración macular, degeneración macular asociada a la edad, artritis, artritis reumatoide, aterosclerosis, retinopatía diabética, hiperplasia tiroidea, enfermedad de Grave, hemangioma, glaucoma neovascular o psoriasis.
55

26. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un inmunoconjugado del mismo, para usar en terapia o diagnóstico in vivo.

27. El anticuerpo o inmunoconjugado de la reivindicación 26, para usar en terapia o diagnóstico in vivo de la reivindicación 26, en donde dicha terapia es de una enfermedad angiogénica por inhibición de la angiogénesis o de una enfermedad linfangiogénica por inhibición de la linfangiogénesis, y donde dicho diagnóstico in vivo es de una enfermedad angiogénica o linfangiogénica.

28. El anticuerpo o inmunoconjugado de la reivindicación 26 o reivindicación 27 para usar en la terapia o diagnóstico in vivo de la reivindicación 26 o reivindicación 27, en donde dicha terapia o diagnóstico in vivo es de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, enfermedad neovascular ocular, degeneración macular, degeneración macular asociada a la edad, artritis, artritis reumatoide, aterosclerosis, retinopatía diabética, hiperplasia tiroidea, enfermedad de Grave, hemangioma, glaucoma neovascular o psoriasis.

29. El anticuerpo o inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, para usar en la terapia de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, que además comprende el uso de un segundo agente terapéutico.

30. El anticuerpo o inmunoconjugado de la reivindicación 29 para usar en la terapia de la reivindicación 29, en donde dicho segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

31. El anticuerpo o inmunoconjugado de la reivindicación 30 para usar en la terapia de la reivindicación 30, en donde dicho segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en análogos de pirimidina, complejos de coordinación de platino y camptotecinas.

32. El anticuerpo o inmunoconjugado de la reivindicación 31 para usar en la terapia de la reivindicación 31, en donde dicho segundo agente terapéutico es 5-fluorouracilo, oxaliplatino, cisplatino o irinotecán.

33. El anticuerpo o inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32 para usar en la terapia o diagnóstico in vivo de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, donde dicha terapia o diagnóstico se lleva a cabo en un sujeto humano.

Figura 1

Secuencia de nucleótidos

CCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGG

NcoI |----- VH Inicio (SEQ ID No20 Inicio)

CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAG
CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTGAA
GATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACA
CATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCATTATACCTTTTAACGGT
ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTG

VH Final -----||-- HindIII--- Inicio de ligador

CATCCGCCCCAAAACCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCAGCGGTAGACATCCGGAT

extremo de ligador -----MluI---||----- VL Inicio

GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG
CCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA
GATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGGAG
GGACCAAGGTGGAGATCAAAGCGGCCCGC (SEQ ID No. 30)

(SEQ ID No.20 Final) VL Final ---| NotI

Secuencia de aminoácidos

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGET

|----- VL Inicio (SEQ ID No 21 Inicio)

IYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSSLRSEDYVYYCATGRSMVRGVIIIPFNGMDVW
GQGT'TVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIRMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ

VH Final-----||-----Ligador-----Ligador---||----- VL Inicio

SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT
YYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK

(SEQ ID No21 Final) VL Final -----|

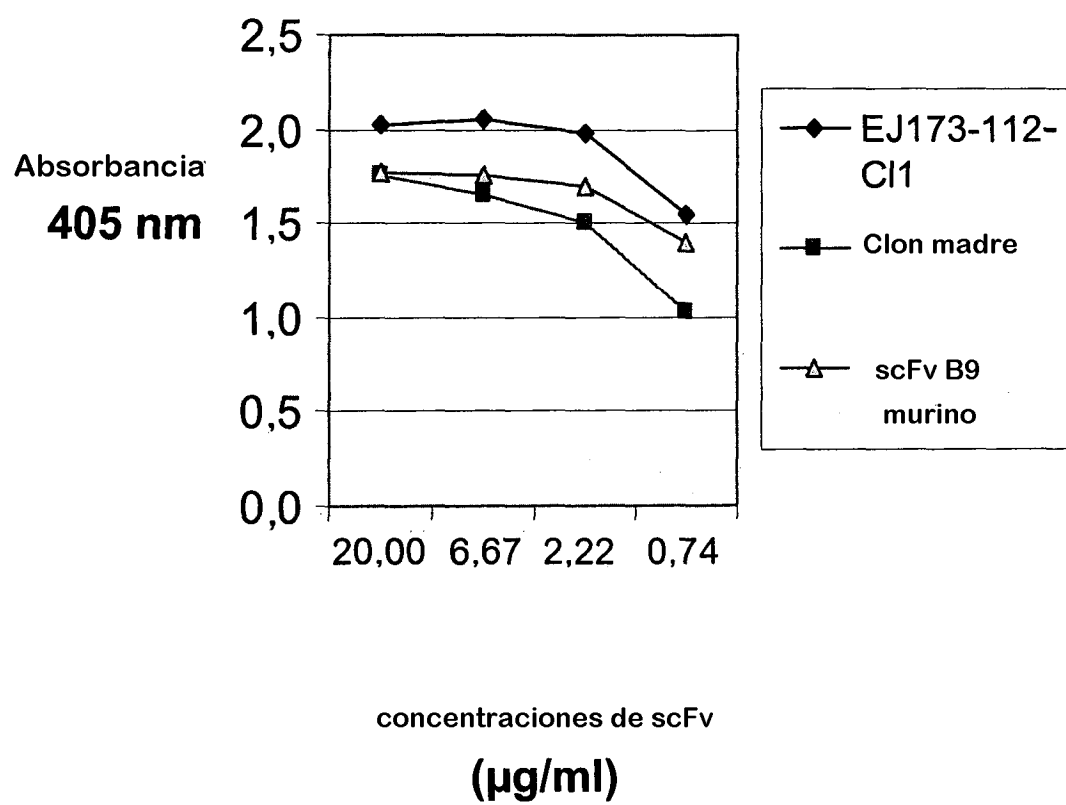
Figura 2

Figura 3

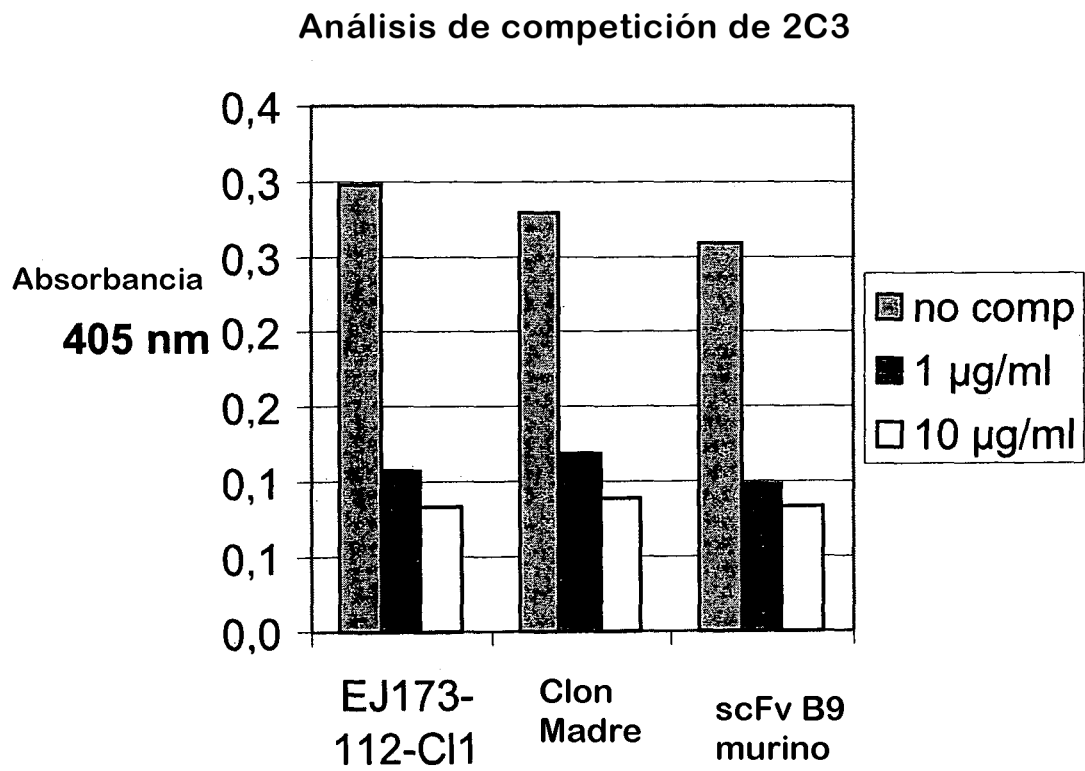


Figura 4

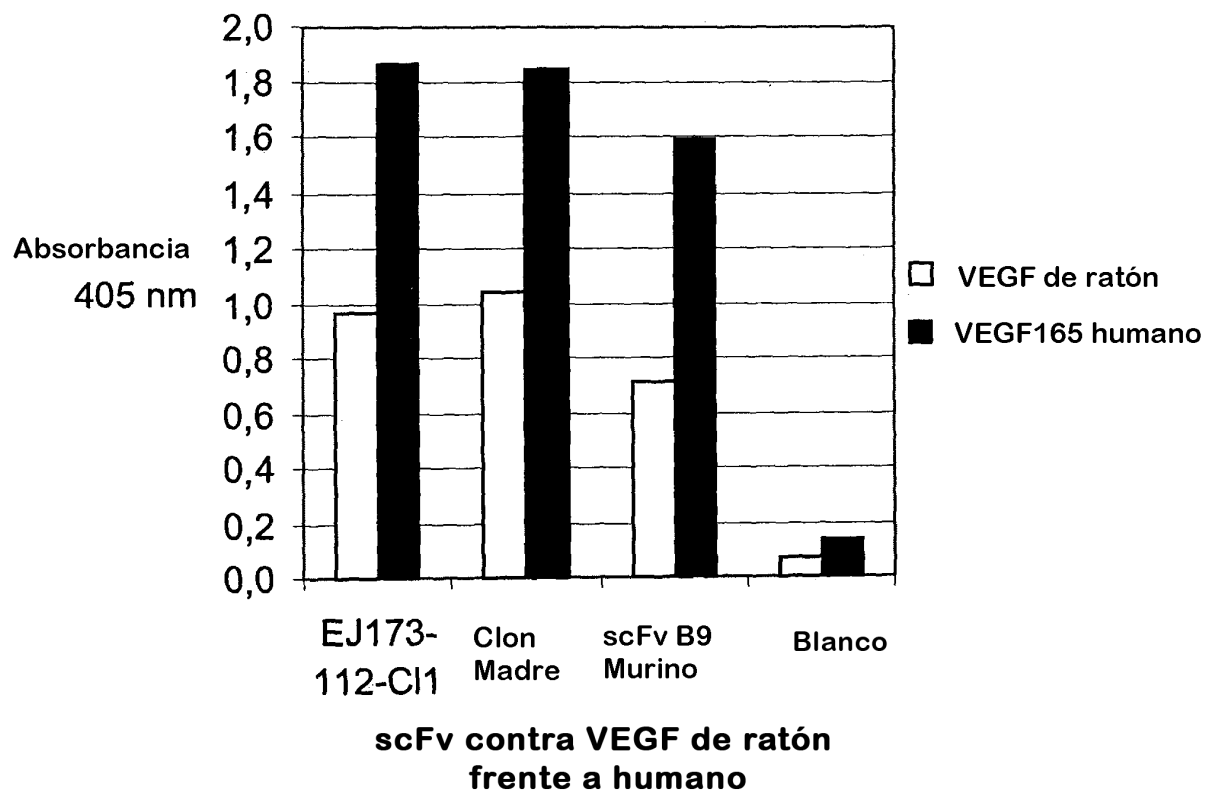


Figura 5

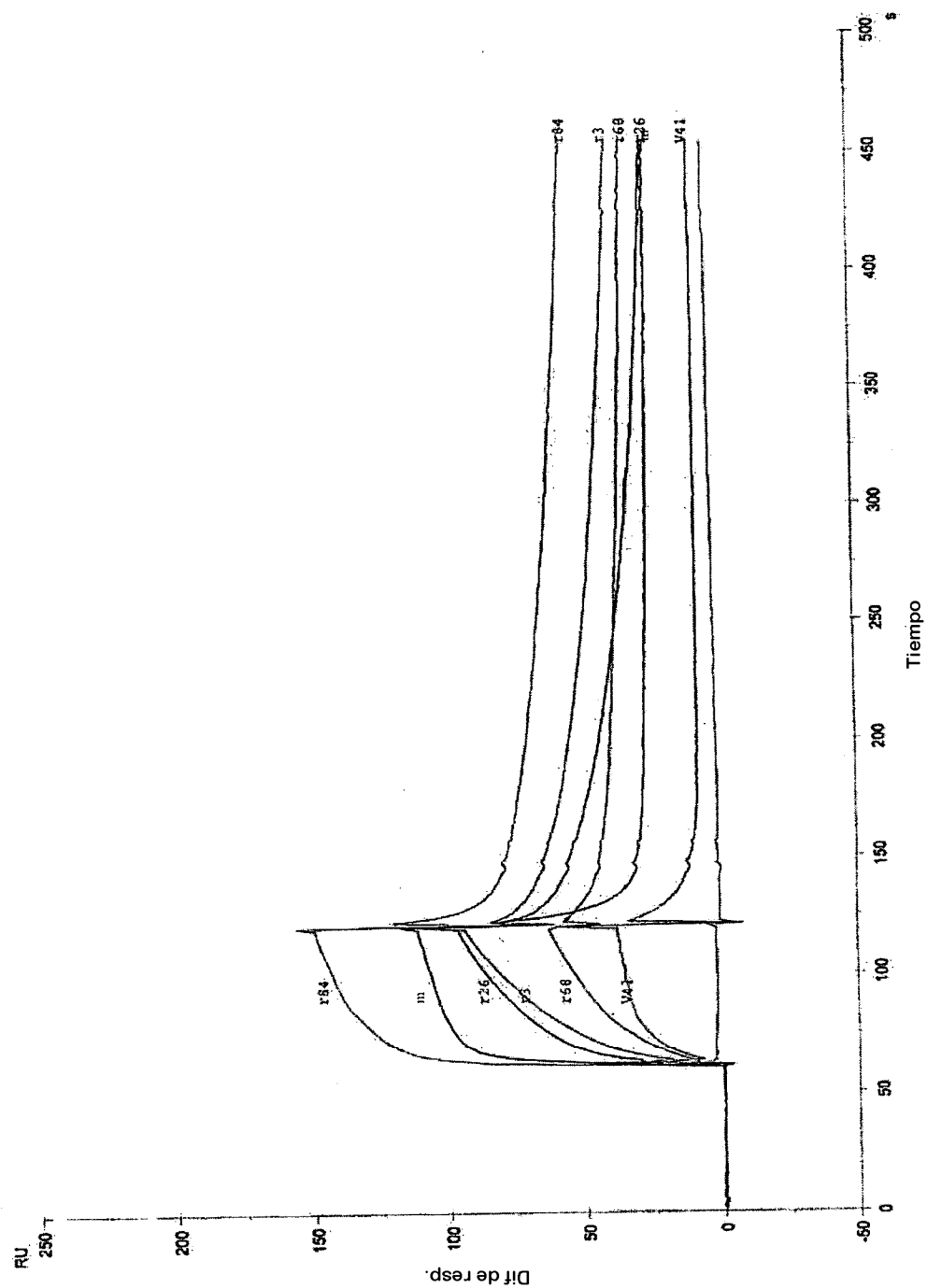


Figura 6

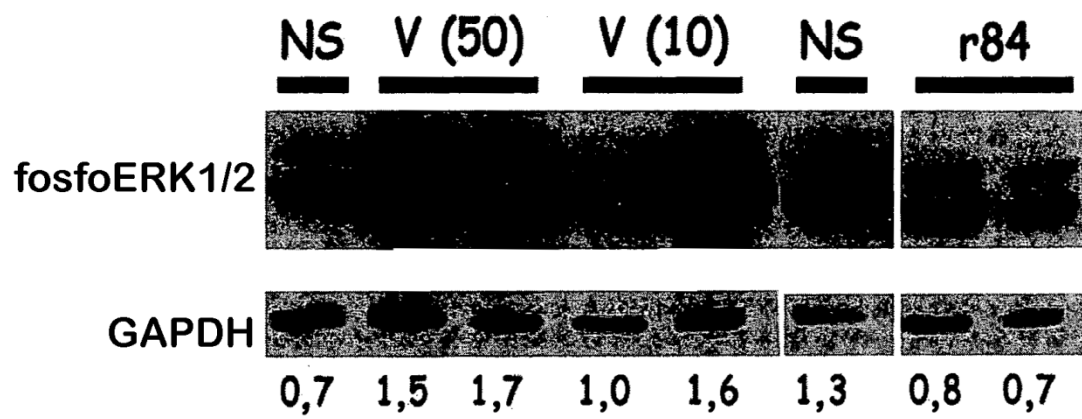
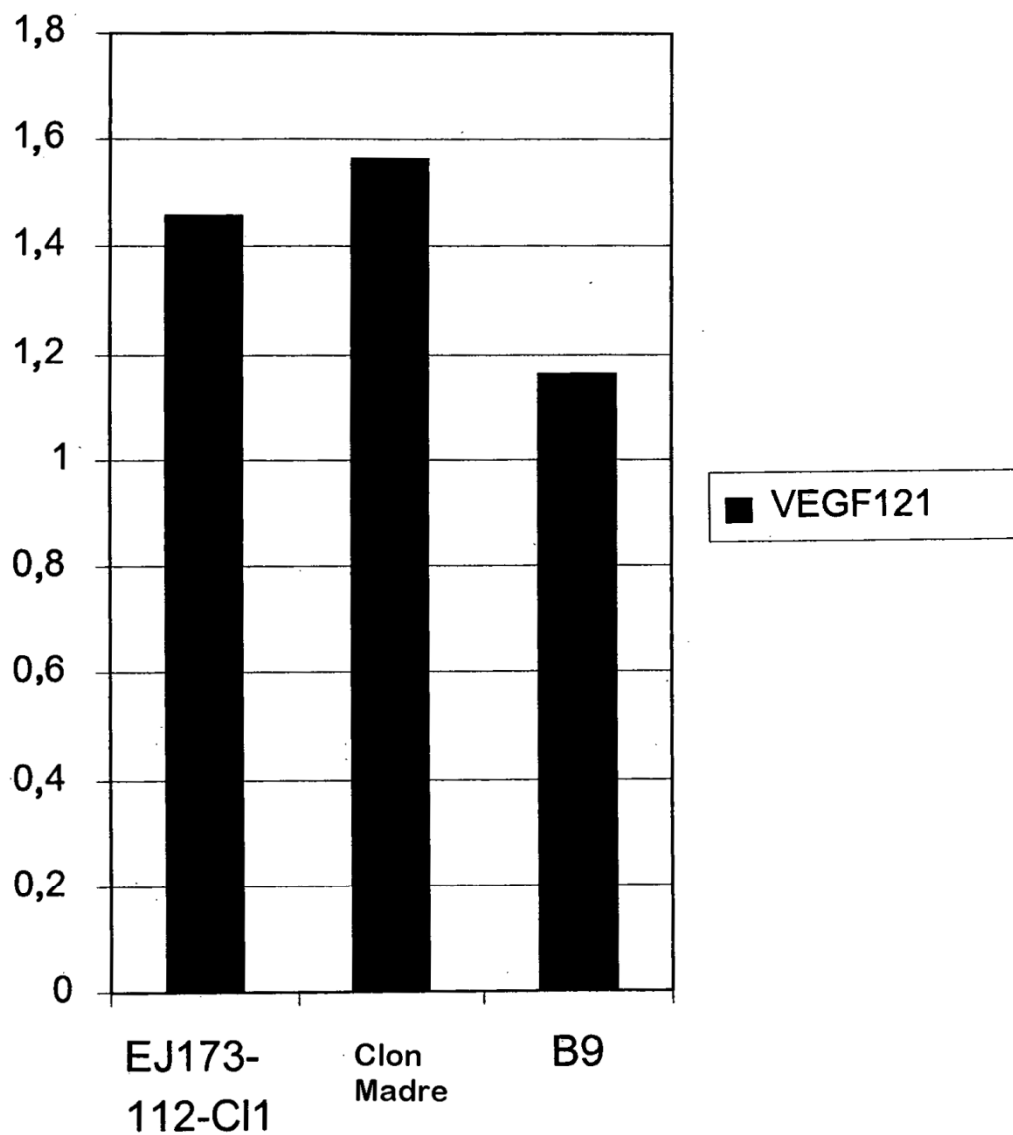


Figura 7

**Absorbancia
405 nm**



scFv contra VEGF isoforma 121

Figura 8A

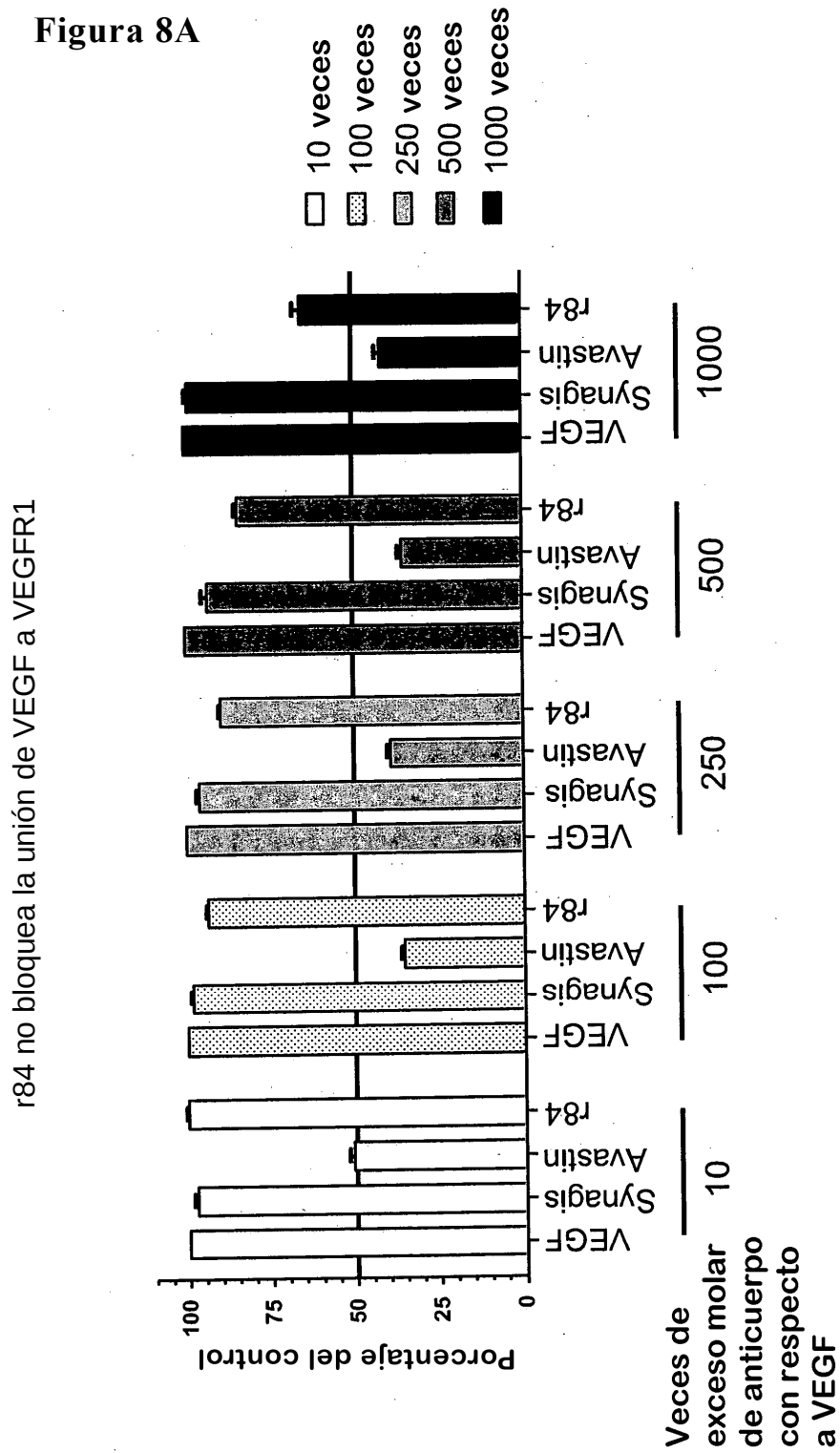


Figura 8B

r84 bloquea VEGF de unirse a VEGFR2

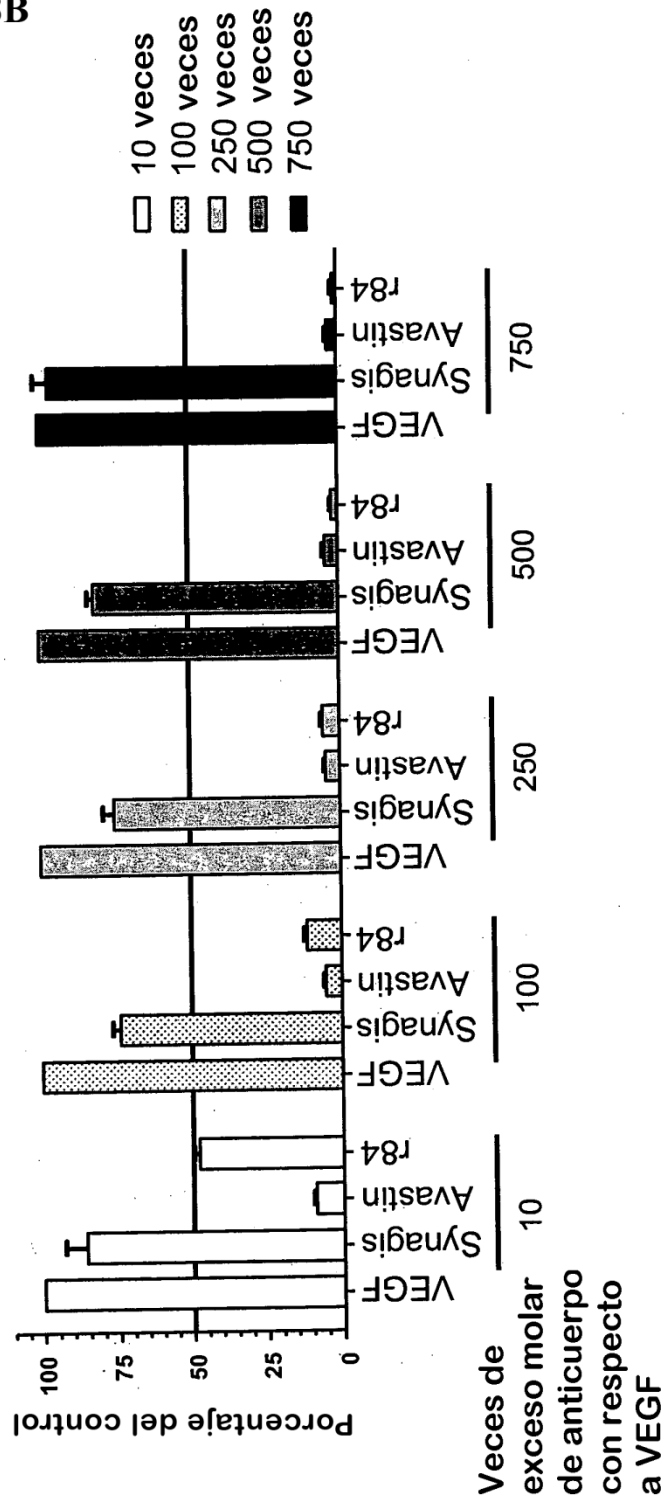
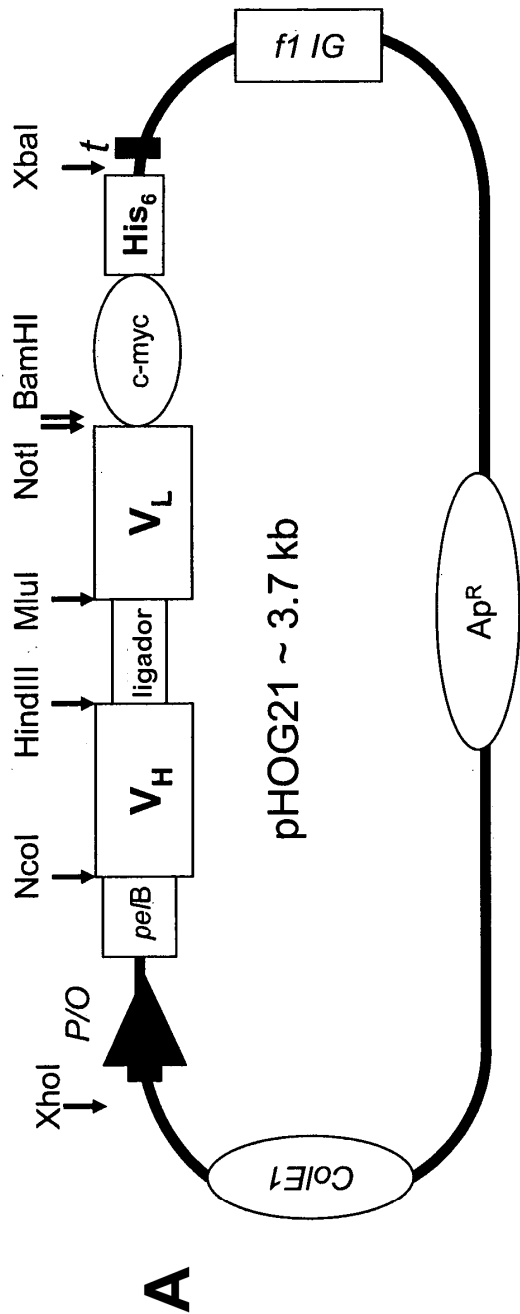


Figura 9



MACROFAGOS EXPRESAN VEGFR2

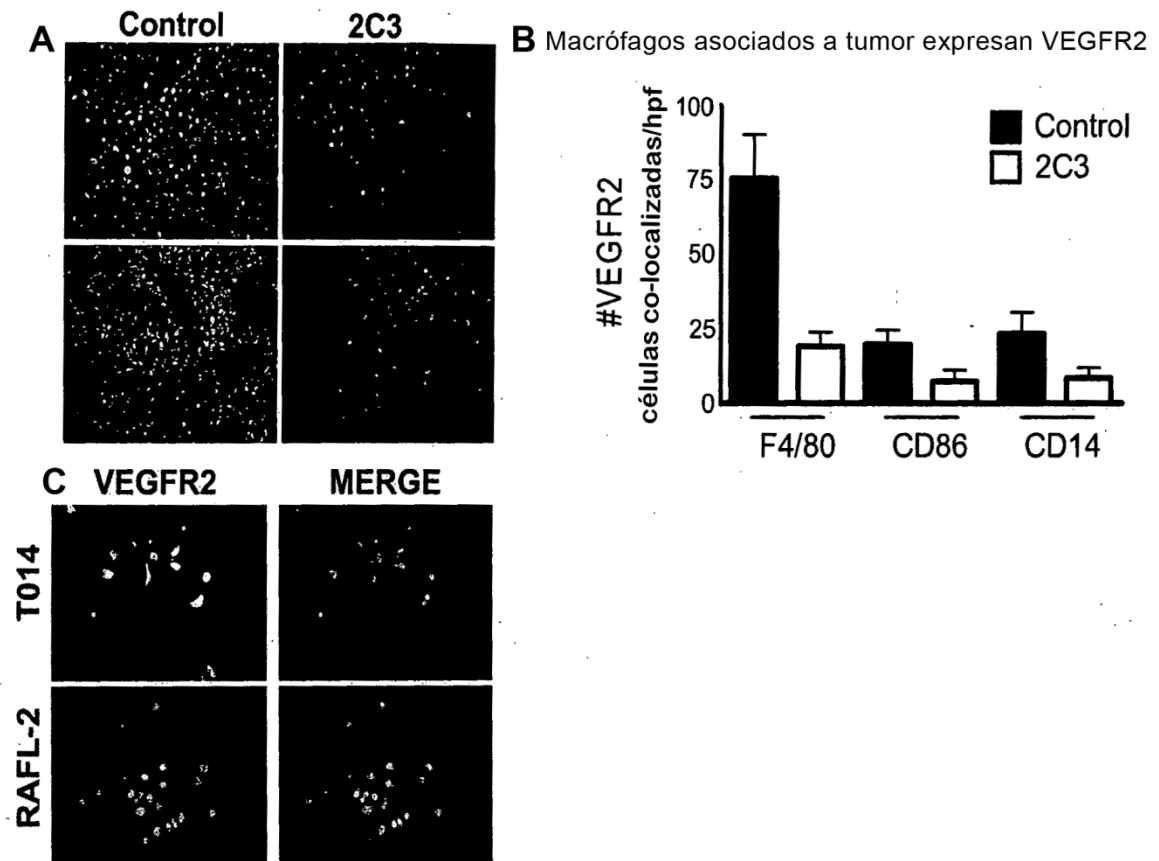


Figura 10

Figura 11

Inhibición del crecimiento de MDA-MB-231

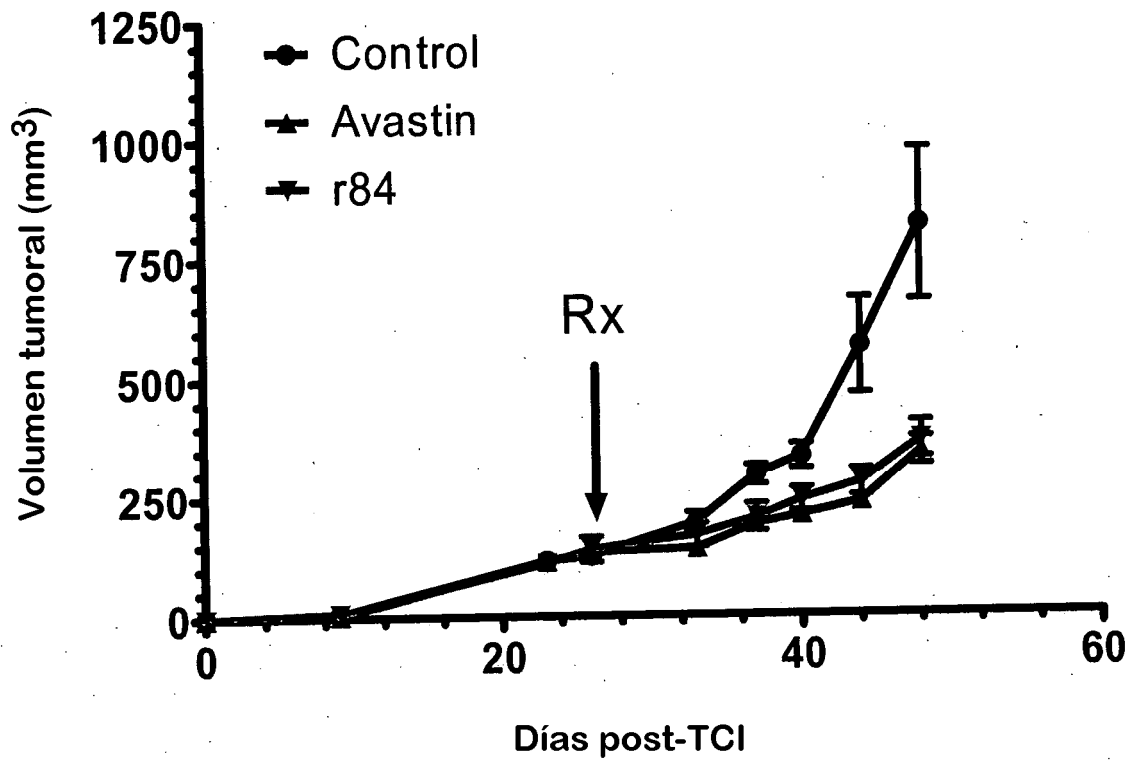


Figura 12

Inhibición de MDA-231

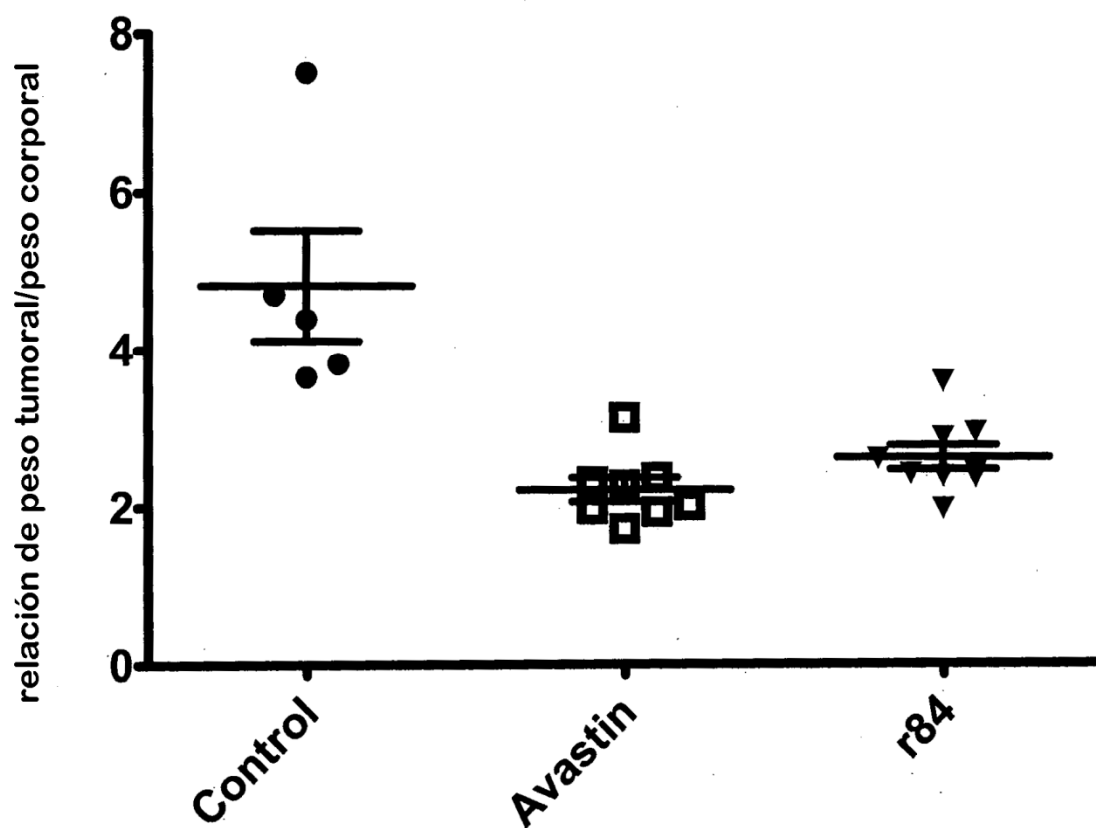


Figura 13

4Mc A673 subcutáneo

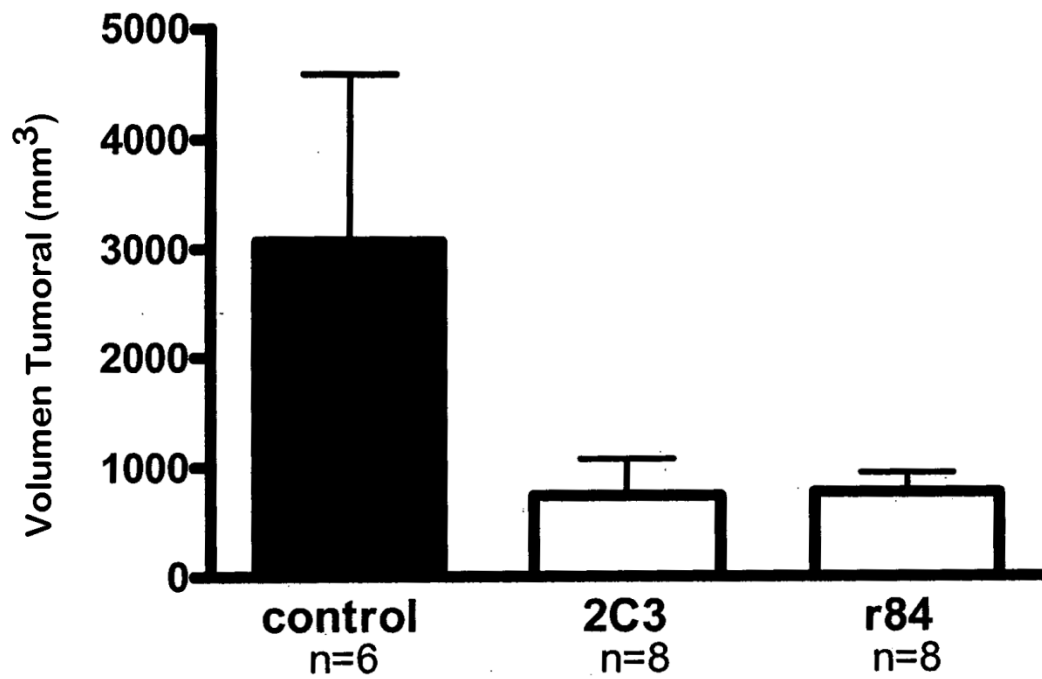


Figura 14

r84 reduce la infiltración de macrófagos en
tumores MDA MB 231

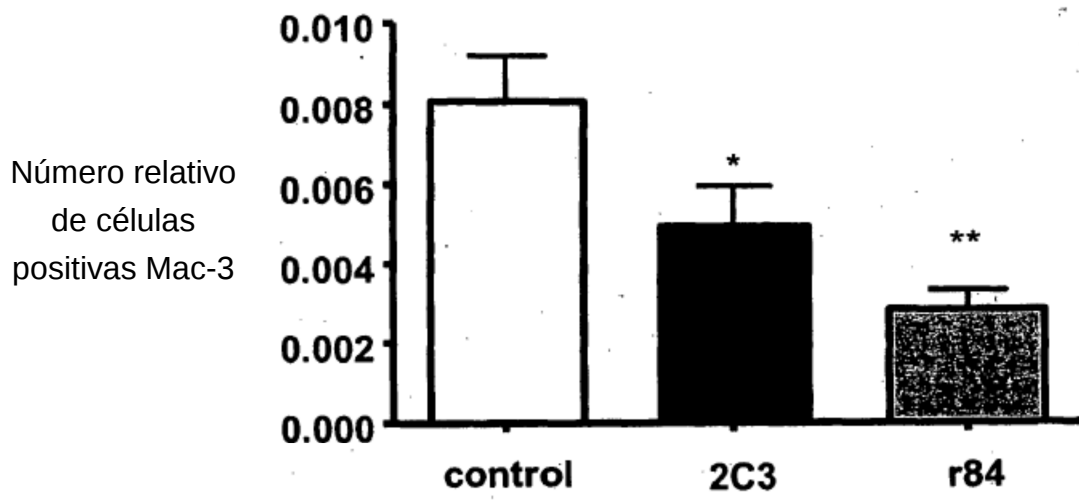
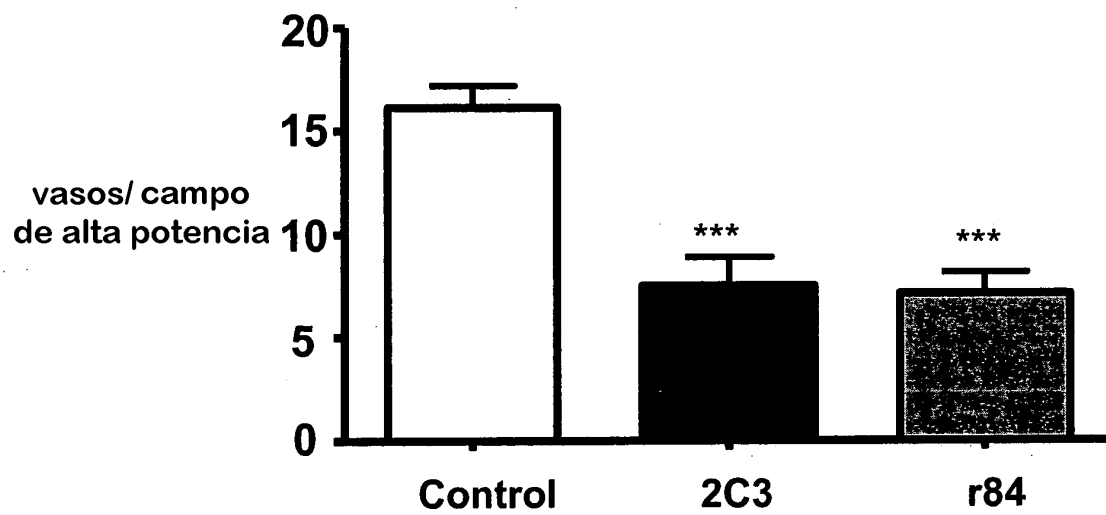


Figura 15

r84 reduce MVD en tumores MDA MB 231



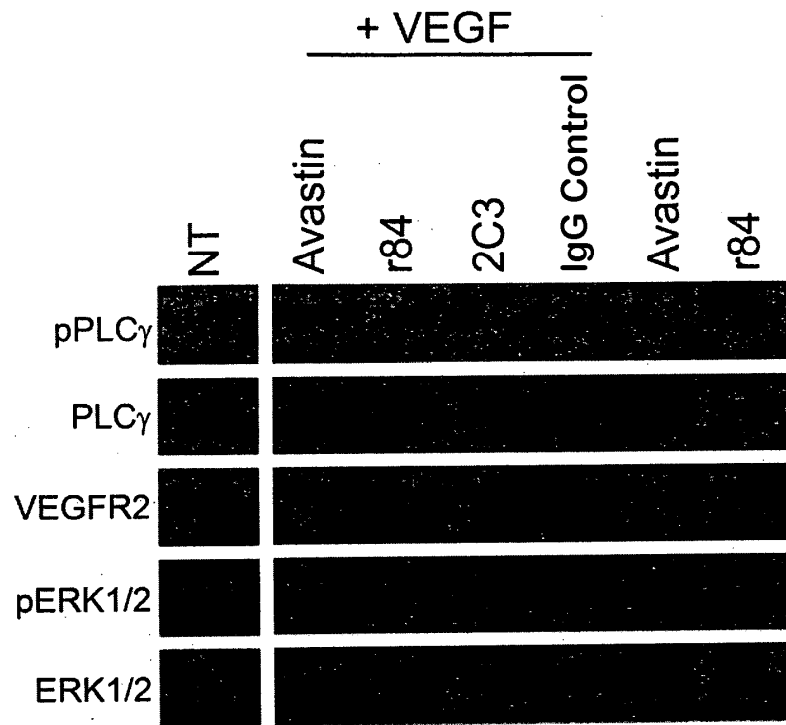


Figura 16 A

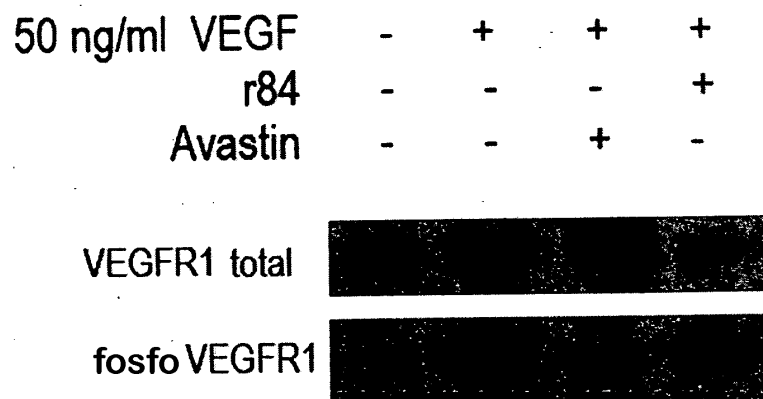


Figura 16 B

Figura 17A

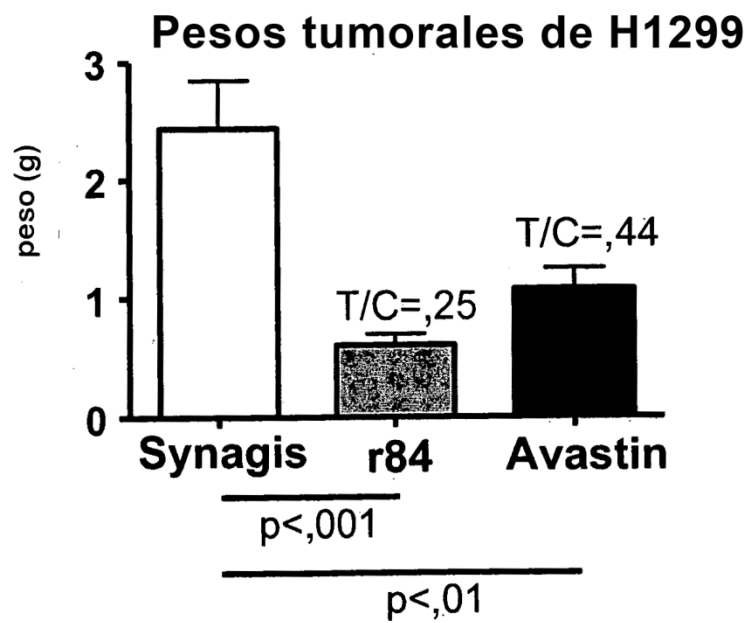
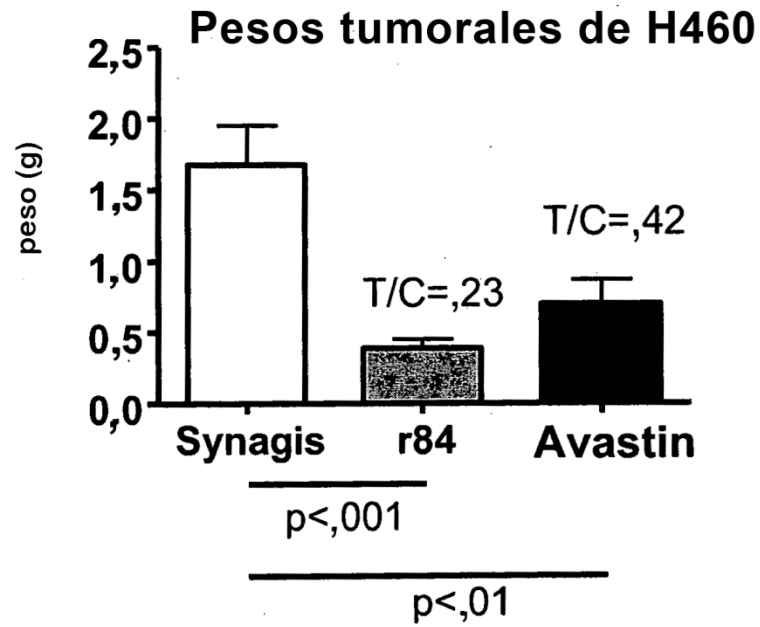


Figura 17B

Figura 17C

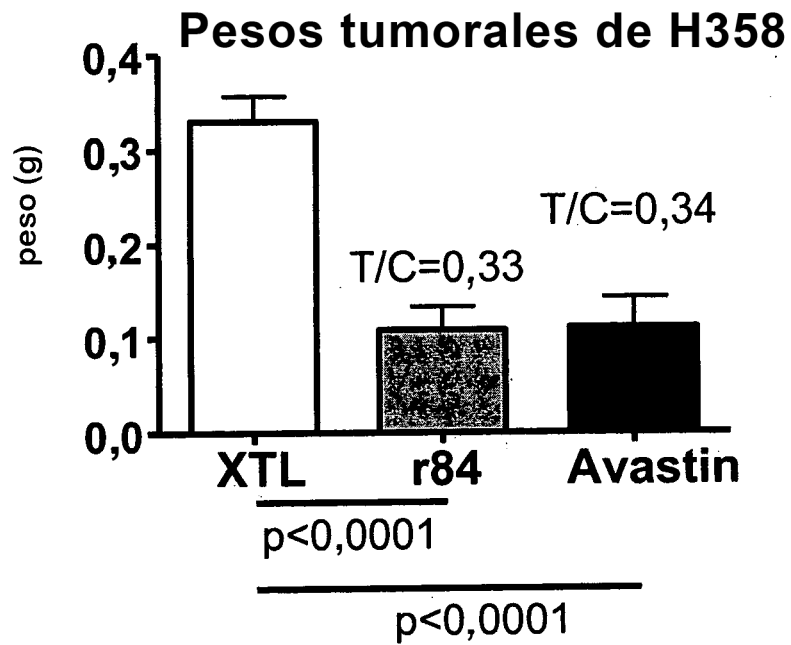


Figura 17D

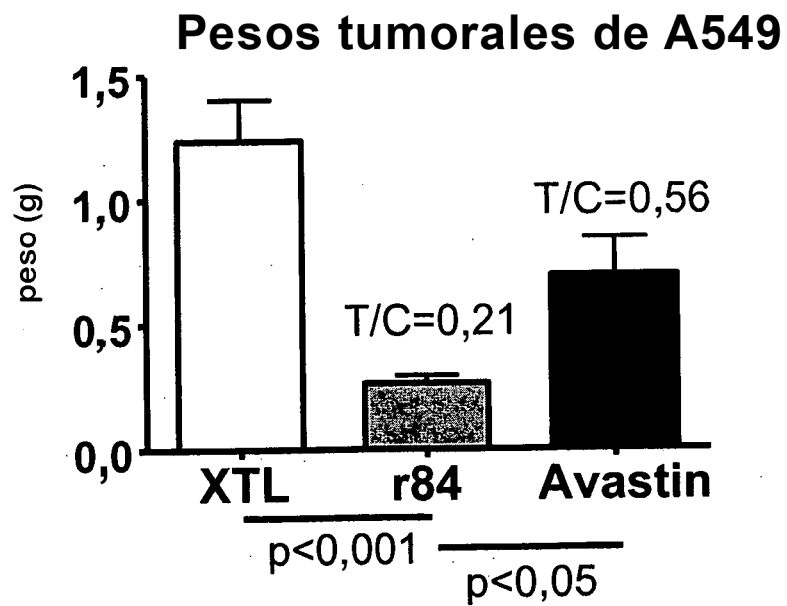


FIGURA 18B

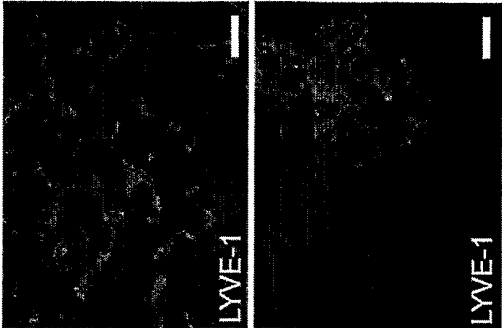
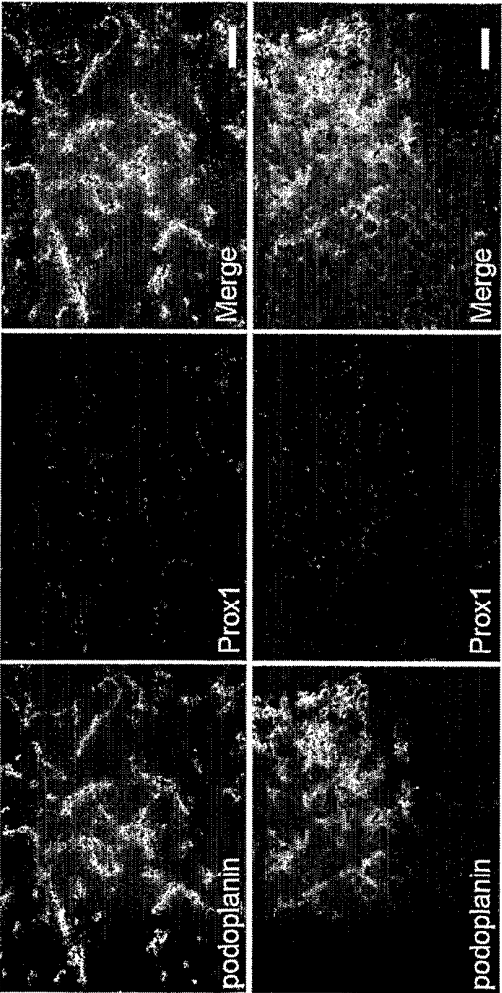


FIGURA 18A



Densidad de vasos linfáticos en tumores MDA-MB-231

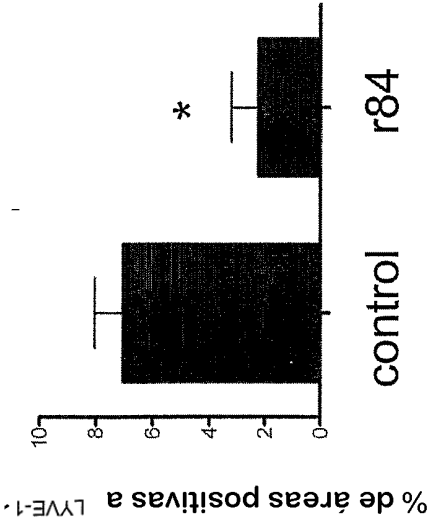


FIGURA 18C

Figura 19

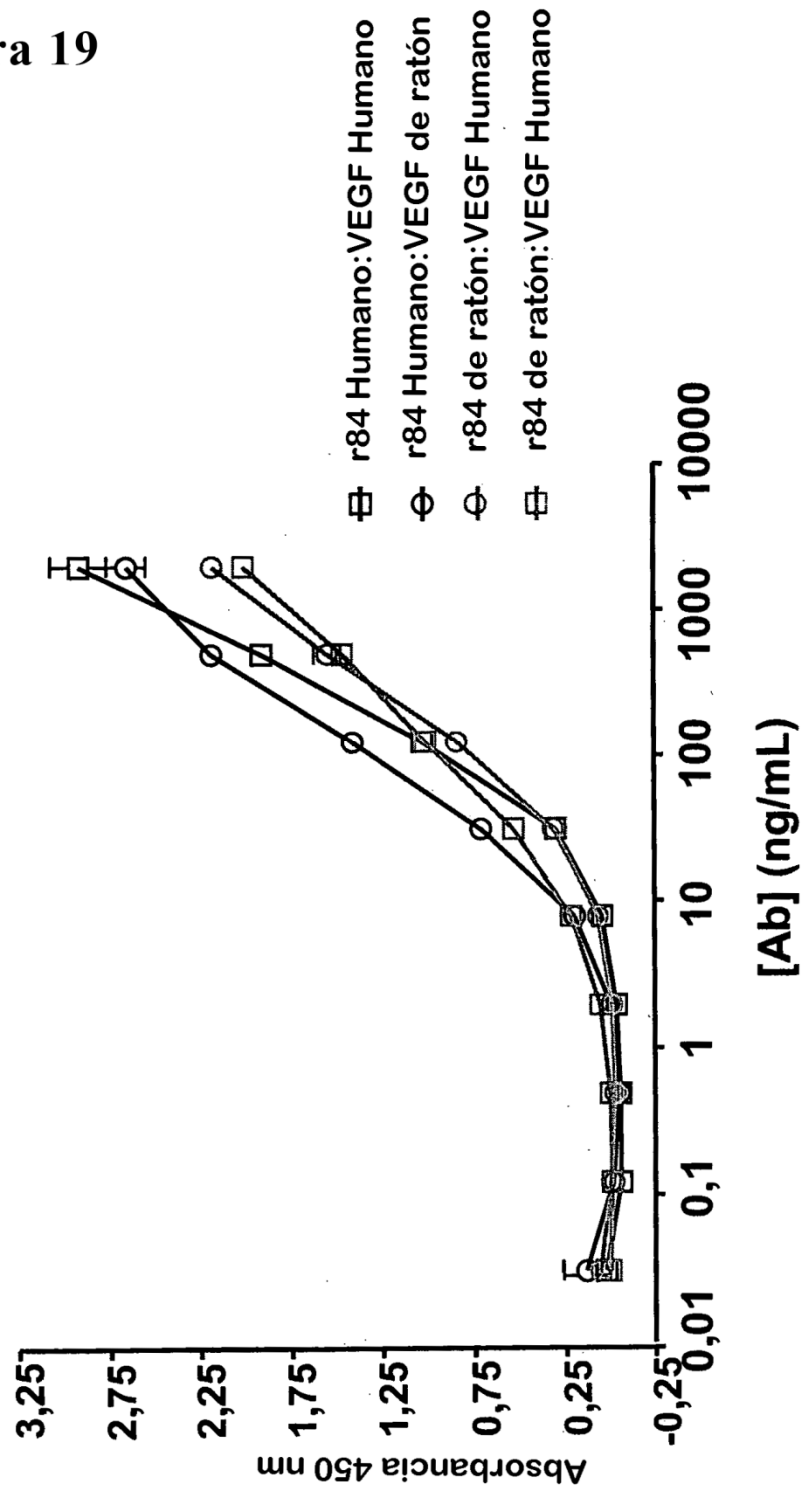


Figura 20A

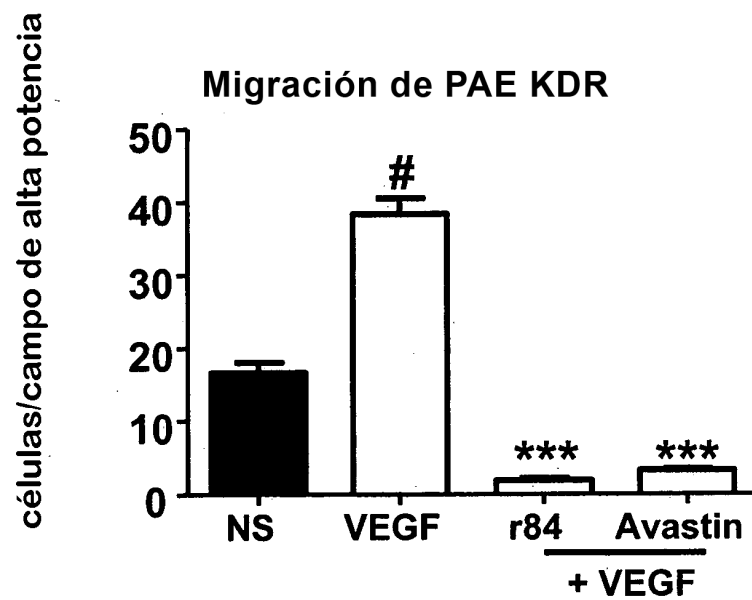
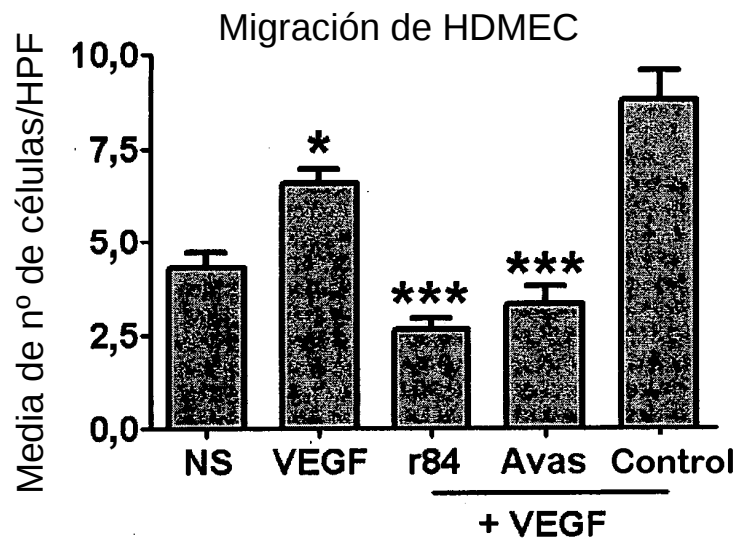


Figura 20B

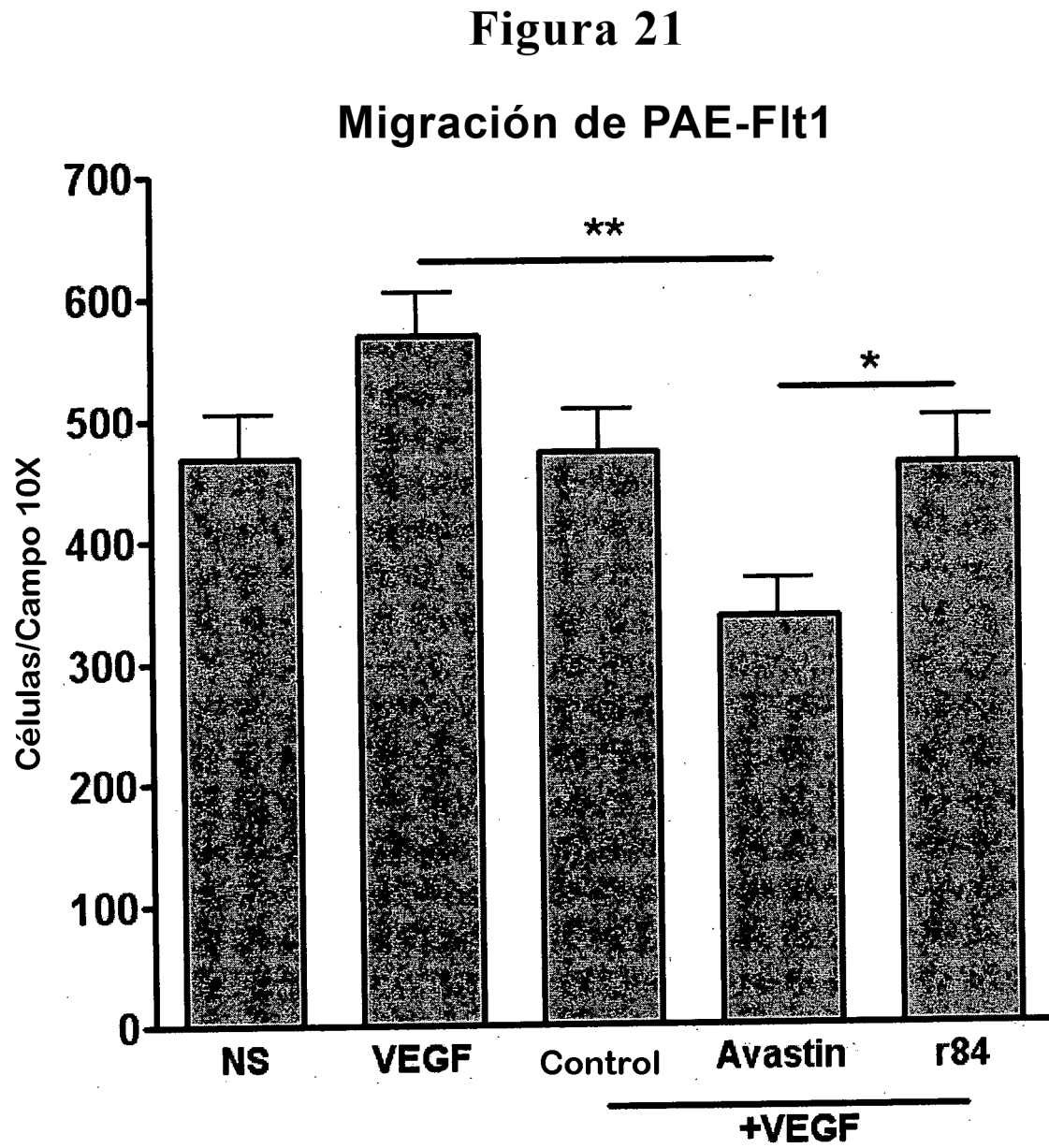


Figura 22

Panc1

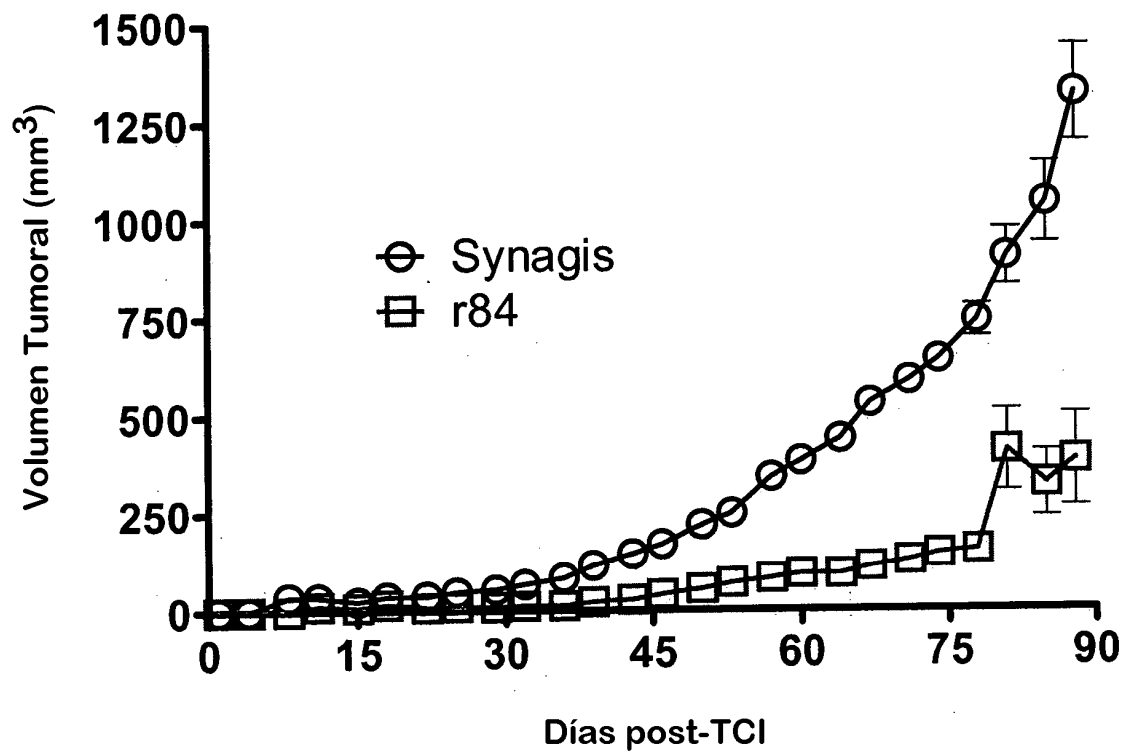


Figura 23

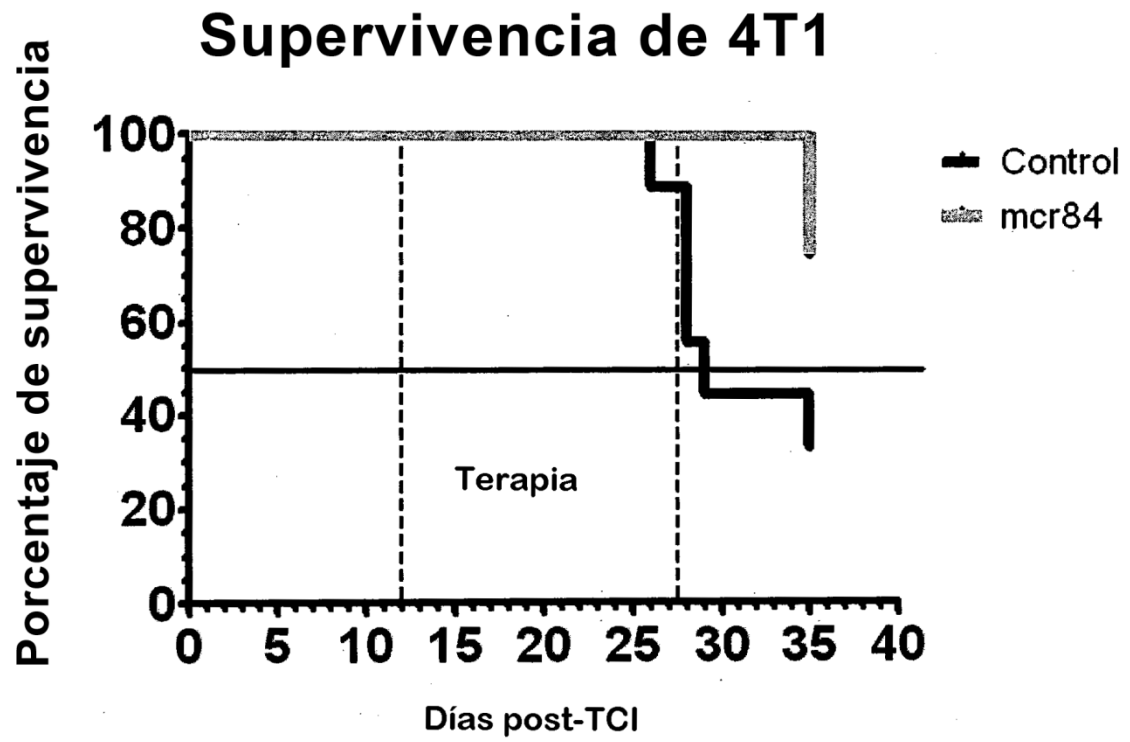


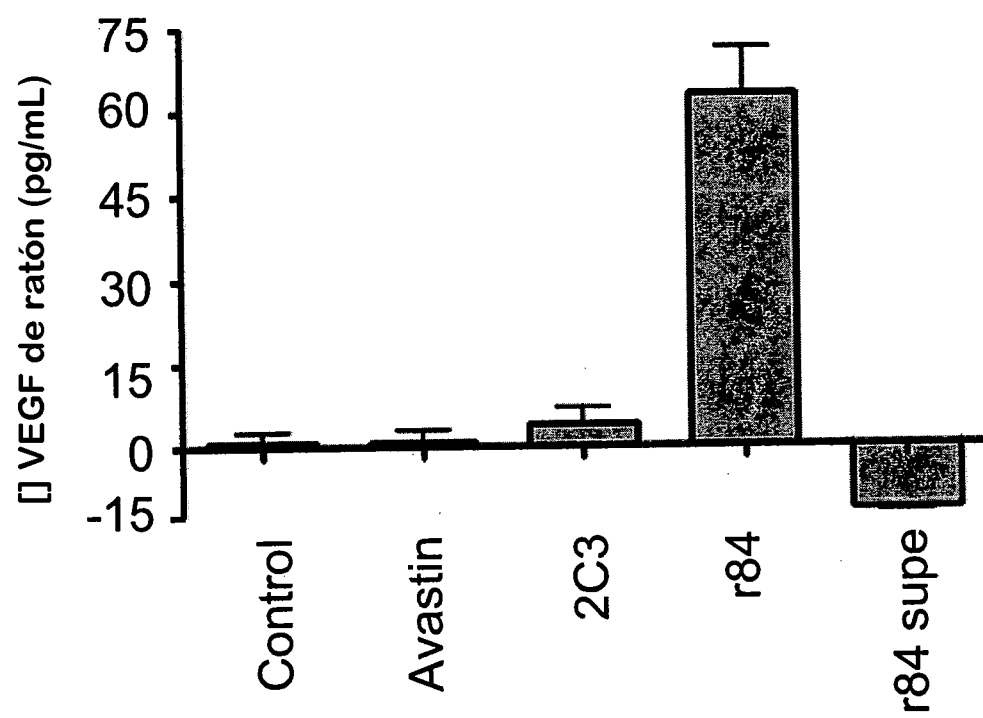
Figura 24

Figura 25