

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 322**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2007** **E 11189401 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2457929**

54 Título: **ELISA para VEGF**

30 Prioridad:

**04.10.2006 US 828203 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MENG, YU-JU G.;**  
**HONG, KYU H y**  
**GUTIERREZ, JOHNNY**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 584 322 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

ELISA para VEGF

5 **Solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica la prioridad sobre y el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos con n.º de serie 60/828.203, presentada el 4 de octubre de 2006.

10 **Campo de la invención**

Esta invención se relaciona con inmunoensayos para detectar determinadas poblaciones de VEGF que pueden usarse como métodos de diagnóstico y pronóstico para pacientes con cáncer, patologías cardiovasculares u otras patologías.

15 **Antecedentes**

Actualmente, está bien establecido que la angiogénesis está implicada en la patogénesis de diversos trastornos. Estos incluyen tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares, tales como retinopatías proliferativas o degeneración macular asociada con la edad (DMAD), artritis reumatoide, y psoriasis (rheumatoid arthritis, and psoriasis (Folkman et al. J. Biol. Chem. 267:10931-10934 (1992); Klags-brun et al. Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); y Garner A, Vascular diseases. In: Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach. Garner A, Klintworth GK, Eds. 2ª edición (Marcel Dekker, NY, 1994), págs. 1625-1710). En el caso de tumores sólidos, la neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja en el crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Por consiguiente, se ha observado una correlación entre la densidad de los microcapilares en secciones de tumores y la supervivencia del paciente en cáncer de mama, así como en algunos otros tumores (Weidner et al. N Engl J Med 324:1-6 (1991); Horak et al. Lancet 340:1120-1124 (1992); y Macchiarini et al. Lancet 340:145-146 (1992)).

La búsqueda de reguladores positivos de la angiogénesis ha ofrecido muchos candidatos, incluyendo, por ejemplo, aFGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, TNF- $\alpha$ , angiogenina, IL-8, etc. (Folkman et al., citado anteriormente, y Klagsbrun et al., citado anteriormente). Algunos de los reguladores negativos identificados hasta ahora, incluyen trombospondina (Good et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6624-6628 (1990)), el fragmento N-terminal de 16 kilodalton de prolactina (Clapp et al. Endocrinology, 133:1292-1299 (1993)), angiostatina (O'Reilly et al. Cell 79:315-328 (1994)), y endostatina (O'Reilly et al. Cell 88:277-285 (1996)).

El trabajo realizado durante algunos de los últimos años ha establecido el papel fundamental del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la regulación de la angiogénesis normal y la anormal (Ferrara et al. Endocr. Rev. 18:4-25 (1997)). El hallazgo de que incluso la pérdida de un alelo individual de VEGF produce mortalidad embrionaria apunta a un irremplazable papel desempeñado por este factor en el desarrollo y la diferenciación del sistema vascular (Ferrara et al., citado anteriormente).

Además, se ha demostrado que el VEGF es un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares (Ferrara et al., citado anteriormente). El ARNm de VEGF se sobreexpresa en la mayoría de los tumores humanos examinados (Berkman et al. J Clin Invest 91:153-159 (1993); Brown et al. Human Pathol., 26:86-91 (1995); Brown et al. Cancer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern et al. Brit. J. Cancer. 73:931-934 (1996); y Dvorak et al. Am J. Pathol. 146:1029-1039 (1995)). También, la concentración de VEGF en los fluidos oculares tiene una correlación alta con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras retinopatías relacionadas con isquemia (Aiello et al. N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994)). Además, los estudios han demostrado la localización de VEGF en las membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados por degeneración macular aguda (DMA) (Lopez et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996)).

Los tejidos producen VEGF pero que no tiene que entrar a la circulación para ejercer su efecto biológico, pero actúa más bien localmente como un regulador paracrino. Un estudio reciente de Yang et al. J. Pharm. Exp. Ther. 284:103 (1998) encontró que la eliminación de rhVEGF<sub>165</sub> de la circulación es muy rápida, lo que sugiere que el VEGF endógeno en la circulación es probablemente el resultado de la síntesis continua de VEGF. Además, varios estudios han tratado de correlacionar los niveles de VEGF circulante con la carga tumoral y han sugerido los niveles de VEGF como un marcador pronóstico potencial (Ferrari and Scagliotti Eur. J. Cancer 32A:2368 (1996); Gasparini et al. J. Natl. Cancer Inst. 89:139 (1997); Kohn Cancer 80:2219 (1997); Baccala et al. Urology 51:327 (1998); Fujisaki et al. Am. J. Gastroenterol. 93:249 (1998)). Claramente, la capacidad de medir adecuadamente VEGF será importante para entender su papel (o papeles) potencial en numerosos procesos biológicos, tales como el mantenimiento de la permeabilidad vascular, el ciclo menstrual, la isquemia, la diabetes, el cáncer, los trastornos intraoculares, etc.

En la bibliografía se informa ampliamente de concentraciones variables de VEGF endógeno en pacientes normales y enfermos, que oscilan entre niveles indetectables y niveles altos. La capacidad de medir los niveles de VEGF

endógeno depende de la disponibilidad de ensayos sensibles y específicos. Se ha informado de ensayos colorimétricos, de quimioluminiscencia y fluorimétricos basados en ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) para VEGF. Houck et al., citado anteriormente, (1992); Yeo et al. Clin. Chem. 38:71 (1992); Kondo et al. Biochim. Biophys. Acta 1221:211 (1994); Baker et al. Obstet. Gynecol. 86:815 (1995); Hanatani et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:1958 (1995); Leith y Michelson Cell Prolif. 28:415 (1995); Shifren et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81:3112 (1996); Takano et al. Cancer Res. 56:2185 (1996); Toi et al. Cancer 77:1101 (1996); Brekken et al. Cancer Res. 58:1952 (1998); Obermair et al. Br. J. Cancer 77:1870-1874 (1998); Webb et al. Clin. Sci. 94:395-404 (1998).

Por ejemplo, Houck et al., citado anteriormente (1992) describen un ELISA colorimétrico que parece tener una sensibilidad de ng/ml, que podría no ser suficientemente sensible para detectar los niveles de VEGF endógeno. Yeo et al., citado anteriormente (1992) describen un ensayo inmunofluorimétrico resuelto en tiempo de dos sitios, sin embargo, no se detectó VEGF en suero normal (Yeo et al. Cancer Res. 53:2912 (1993)). Baker et al., citado anteriormente (1995), usando una versión modificada de este ensayo inmunofluorimétrico, informaron de niveles detectables de VEGF en el plasma de gestantes, observando mayores niveles en mujeres con preeclampsia. Anthony et al. Ann. Clin. Biochem. 34:276 (1997) informaron de datos similares en gestantes utilizando un radioinmunoensayo. Hanatani et al., citado anteriormente (1995) desarrollaron un ELISA quimioluminiscente capaz de medir VEGF circulante e informaron de niveles de VEGF en sueros de 30 individuos normales (hombres y mujeres) de 8-36 pg/ml. Brekken et al, citado anteriormente (1998) describieron ensayos ELISA usando anticuerpos que tenían preferencia de unión tanto solo con VEGF como con el complejo VEGF:Flk-1.

Está disponible en el mercado un kit de ELISA de R&D Systems (Minneapolis, MN) para la detección de VEGF. El kit de ELISA VEGF de R&D se ha utilizado en ensayos de tipo "sándwich" en donde se utiliza un anticuerpo monoclonal para capturar el antígeno diana en VEGF y se usa un anticuerpo policlonal para detectar el VEGF. Webb et al. citado anteriormente (1998). Véase también, por ejemplo, Obermair et al., citado anteriormente (1998).

Keyt et al. J. Biol. Chem. 271:7788-7795 (1996); Keyt et al. J. Biol. Chem. 271:5638 (1996); y Shifren et al., citado anteriormente (1996) también desarrollaron un ELISA colorimétrico basado en un par de anticuerpos monoclonales duales. A pesar de que este ELISA era capaz de detectar niveles elevados de VEGF en pacientes con cáncer, carecía de la sensibilidad necesaria para medir niveles endógenos de VEGF en individuos normales. Rodriguez et al. J. Immunol. Methods 219:45 (1998) describieron un ELISA fluorimétrico de dos sitios para VEGF que alcanzaba una sensibilidad de 10 pg/ml de VEGF en suero o plasma limpios. Sin embargo, este ensayo fluorimétrico detecta las especies 165/165 y 165/110 de VEGF totalmente intactas (se ha informado de que VEGF 165/165 puede escindir proteolíticamente en otras tres formas: un heterodímero 165/110, un homodímero 110/110 y un fragmento C-terminal de 55 aminoácidos ((Keyt et al. J. Biol. Chem. 271:7788-7795 (1996); Keck et al. Arch. Biochem. Biophys. 344:103-113 (1997)).

Por tanto, existe una necesidad de desarrollar un ensayo de diagnóstico y pronóstico que detecte niveles altamente medibles de VEGF en una muestra biológica de un modelo animal o un paciente que los ELISA ya existentes, y/o pueda medir diferentes isoformas de VEGF.

## Sumario

Para detectar formas de VEGF en muestras biológicas se desarrollaron métodos anticuerpo-ELISA de tipo "sándwich" para VEGF como un antígeno. El ELISA VEGF proporcionado en el presente documento es capaz de detectar isoformas de VEGF y fragmentos de VEGF mayores de 110 ("VEGF<sub>110</sub>"). La invención proporciona kits, tal como se definen en las reivindicaciones, para dichos ELISA de VEGF.

Por ejemplo, los métodos para detectar formas selectivas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mayores de 110 aminoácidos (VEGF<sub>110</sub>) en una muestra biológica comprenden las etapas de: (a) poner en contacto e incubar la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado en un soporte sólido, en donde el reactivo de captura es un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo 5C3 contra VEGF humano, uniéndose dicho anticuerpo monoclonal específicamente a restos mayores de 110 de VEGF humano; (b) separar la muestra biológica de los reactivos de captura inmovilizados; (c) poner en contacto el complejo formado por el reactivo de captura inmovilizado y la molécula diana con un anticuerpo detectable que se une a los dominios de unión a receptores FLT1 y/o KDR de VEGF; y (d) medir el nivel de VEGF<sub>110+</sub> unido a los reactivos de captura usando un medio de detección para el anticuerpo detectable. En determinadas realizaciones, el anticuerpo detectable se une a un epítipo en VEGF 1-110. En determinadas realizaciones, se puede llevar a cabo un ELISA de comparación para detectar diferentes tipos de VEGF. En determinadas realizaciones, la muestra biológica (por ejemplo, muestras de tumores o de lisados tumorales, plasma, suero u orina, etc.) se aísla de un sujeto humano.

En una realización, el reactivo de captura es el anticuerpo monoclonal 5C3. En una realización, el reactivo de captura inmovilizado recubre una placa de microtitulación. En determinadas realizaciones, el anticuerpo detectable es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo detectable es un anticuerpo monoclonal murino. En una realización, el anticuerpo monoclonal inmovilizado es el MAb 5C3 y el anticuerpo detectable es MAb A4.6.1. En determinadas realizaciones el anticuerpo detectable es directamente detectable. En una realización, el anticuerpo

detectable se amplifica mediante un reactivo colorimétrico. En una realización, el anticuerpo detectable está biotinilado y el medio de detección es avidina o estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'- tetrametil benzidina.

5 En determinadas realizaciones de la invención, el sujeto humano es un paciente con enfermedad vascular, diabético o con cáncer y la etapa de medición (d) además comprende una comparación con una curva patrón para determinar el nivel de VEGF en comparación con un individuo normal. Se proporcionan kits. Por ejemplo, un kit de inmunoensayo, para detectar formas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mayores de 110 aminoácidos (VEGF<sub>110+</sub>) incluyendo VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> pero no VEGF<sub>110</sub> en una muestra biológica puede comprender: (a) como reactivo de captura, un anticuerpo contra VEGF humano, en donde el anticuerpo monoclonal se une específicamente a los restos mayores de 110 de VEGF humano; y (b) como reactivo de detección, un anticuerpo detectable que se une a los dominios de unión a los receptores KDR y/o FLT1 de VEGF. En determinadas realizaciones, el anticuerpo detectable se une a un epítipo en VEGF1-110. En determinadas realizaciones, el kit, también comprende un soporte sólido para los reactivos de captura. Por ejemplo, los reactivos de captura pueden inmovilizarse en el soporte sólido (por ejemplo, una placa de microtitulación). En determinadas realizaciones, el kit también comprende un medio de detección (por ejemplo, medio colorimétrico, medio fluorimétrico, etc.) para los anticuerpos detectables. En determinadas realizaciones, el kit también comprende VEGF purificado como antígeno patrón. En determinadas realizaciones de la invención, puede proporcionarse un ELISA VEGF adicional o más para estudios de comparación con el ELISA VEGF<sub>110+</sub>. En una realización, el kit incluye un anticuerpo monoclonal como reactivo de captura, que es el anticuerpo monoclonal murino MAb 5C3 y un anticuerpo detectable, que es el MAb A4.6.1.

15 En otra realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo 5C3 anti-VEGF (que puede obtenerse del o producirse por el hibridoma depositado en la ATCC con el número PTA-7737). La invención también proporciona un anticuerpo que no se une a VEGF 1-110 y que se une al mismo epítipo de VEGF<sub>110+</sub> que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma PTA-7737. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención está conjugado con un marcador detectable. En una realización, se proporciona el hibridoma 5C3.1.1 depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-7737.

#### Breve descripción de las figuras

30 **Figura 1**, los Paneles **A**, **B** y **C** ilustran la detección de moléculas VEGF<sub>165</sub> recombinante, VEGF<sub>121</sub>(1) (truncado, que probablemente carece de aproximadamente 9 aminoácidos del extremo carboxi según el fabricante, R&D systems), VEGF<sub>121</sub> (2) (de Pepro Tech), VEGF<sub>110</sub> (fragmento N-terminal generado por digestión de VEGF con plasmina) y VEGF<sub>8-109</sub> (VEGF artificial con los aminoácidos 8-109 de VEGF<sub>165</sub>) por diferentes ensayos ELISA para VEGF. (A) ELISA A que utiliza 3.5F8 para el recubrimiento y A4.6.1 biotinilado para la detección. (B) ELISA B que utiliza A4.6.1 para el recubrimiento y 2E3 biotinilado para la detección. (C) ELISA C que utiliza 5C3 para el recubrimiento y A4.6.1 biotinilado para la detección.

35 La **Figura 2** ilustra la transferencia de proteínas de VEGF producida por células A673, usando 3.5F8 (izquierda) o A4.6.1 (derecha) para la exploración. Las muestras son VEGF purificado de medio acondicionado de células A673 utilizando una columna de afinidad para A4.6.6. (carril 1) y proteínas recombinantes de VEGF, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub> (que probablemente carece de aproximadamente 9 aminoácidos del extremo carboxi según el fabricante, R&D systems) y VEGF<sub>8-109</sub> producido por *E. Coli* (carriles 2,3, y 4, respectivamente).

40 La **Figura 3** ilustra un diagrama de VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>110</sub> (fragmento N-terminal generado por digestión de VEGF con plasmina) que muestra los sitios de unión propuestos de los anticuerpos utilizados en los tres ensayos ELISA para VEGF.

#### Descripción detallada

##### Definiciones

50 Antes de describir con detalle la presente invención, debe entenderse que esta no está limitada a composiciones o a sistemas biológicos particulares que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene como propósito describir únicamente realizaciones particulares, y no se pretende que sean limitantes. Tal y como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "uno" y "el" o "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

60 El término "VEGF", como se usa en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento celular vascular endotelial de 121-, 145-, 189-, y 206 aminoácidos, como describen Leung et al. Science 246:1306 (1989), Houck et al. Mol. Endocrin. 5:1806 (1991), y Neufeld et al., *citado anteriormente*, junto con las formas alélicas producidas de forma natural y las procesadas de estos factores de crecimiento. Véase también, por ejemplo, la Fig.1 A y B de la Patente de Estados Unidos N° 6.057.428. El fragmento de VEGF activo puede liberarse del VEGF-unido a MEC por escisión con plasmina, generando los 110 primeros aminoácidos (véase, por ejemplo, Keyt BA, et al.; The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. J Biol Chem. 271: 7788-7795

(1996)). Como se utiliza en el presente documento "VEGF<sub>110+</sub>", se refiere a fragmentos de VEGF que son mayores de 110 aminoácidos (del N-terminal), pero no incluye los primeros 110 aminoácidos o fragmentos más pequeños (por ejemplo, VEGF<sub>8-10</sub>).

5 El término "detectar" se usa en el sentido más amplio para incluir mediciones tanto cualitativas como cuantitativas de una molécula diana. En un aspecto, el método de detección tal como se describe en el presente documento, se usa para identificar la mera presencia de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF en una muestra biológica. En otro aspecto, el método se usa para ensayar si tanto VEGF<sub>110+</sub> como VEGF están a un nivel detectable en una muestra. En otro aspecto adicional, el método se puede utilizar para cuantificar la cantidad de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF en una muestra y además comparar los niveles de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF de diferentes muestras.

15 La expresión "muestra biológica" se refiere a una muestra corporal de cualquier animal, pero preferentemente es de un mamífero, más preferentemente de un ser humano. En determinadas realizaciones, dicha muestra biológica es de un paciente con enfermedad vascular, diabético o con cáncer. Dichos ejemplos incluyen fluidos biológicos tales como suero, plasma, fluido vítreo, fluido linfático, fluido sinovial, fluido folicular, fluido seminal, fluido amniótico, leche, sangre completa, orina, fluido cefalorraquídeo, saliva, esputo, lágrimas, sudor, moco, lisados tumorales y medio de cultivo tisular, así como extractos tisulares, tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral y extractos celulares. En determinadas realizaciones, la muestra es una muestra corporal de cualquier animal, en una realización es de un mamífero, en una realización de un sujeto humano. En una realización, dicha muestra biológica es de pacientes clínicos.

25 La expresión "anticuerpo detectable" se refiere a un anticuerpo que es capaz de detectarse bien directamente mediante un marcador amplificado por un medio de detección, o indirectamente, por ejemplo, mediante otro anticuerpo que está marcado. Para el marcaje directo, el anticuerpo se conjuga normalmente con un resto que es detectable por algún medio. En una realización, el anticuerpo detectable es un anticuerpo biotinilado.

30 La expresión "medio de detección" se refiere a un resto o a una técnica que se utiliza para detectar la presencia del anticuerpo detectable en el ELISA del presente documento e incluye agentes de detección que amplifican el marcador inmovilizado tal como el marcador capturado en una placa de microtitulación. En una realización, el medio de detección es un agente de detección colorimétrico tal como avidina o estreptavidina-HRP.

35 La expresión "reactivo de captura" se refiere a un reactivo capaz de unirse con y capturar una molécula diana en una muestra, de tal manera que, en condiciones apropiadas, el complejo formado por el reactivo de captura y la molécula diana pueden separarse del resto de la muestra. Normalmente, el reactivo de captura está inmovilizado o puede inmovilizarse. En un inmunoensayo de tipo sándwich, el reactivo de captura es preferentemente un anticuerpo o una mezcla de diferentes anticuerpos contra un antígeno diana.

40 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos lo suficientemente largos para exhibir la actividad biológica deseada.

45 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región variable o de unión al antígeno de estos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

50 Para los propósitos del presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende los dominios variables de las cadenas ligera y pesada, así como una región Fc.

55 Los "anticuerpos nativos" son frecuentemente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L, *Light*) idénticas y dos cadenas pesadas (H, *Heavy*) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de un número de dominios constante. Cada cadena ligera tiene, en un extremo, un dominio variable (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

65 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones producidas de forma natural, que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos

convencionales (policlonales), que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan por el cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden fabricarse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al. *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o de la cadena ligera es idéntica con u homologa a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico con u homologa a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que estos exhiban la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés del presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo; monos del viejo mundo, tales como babuino, mono Rhesus o momo cinomolgo) y secuencias de la región constante humanas (Patente de Estados Unidos N° 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos, que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR, *Framework Region*) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan posteriormente para refinar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá también al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc); normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). En una realización, se proporciona un anticuerpo 5C3 humanizado y se utilizan los métodos proporcionados en el presente documento.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena pesada como de cadena ligera. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Cada uno de los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración en lámina- $\beta$ , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura en lámina- $\beta$ . En cada cadena, las regiones hipervariables 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 (véanse Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5ª Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

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

El fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento antigénico y un sitio de unión a antígeno completos. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en fuerte asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Conjuntamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno. Sin

embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

5 El 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 la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento, Fab'-SH recibe el nombre de Fab' donde el resto (o restos) de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab') del anticuerpo se produjeron  
10 originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.  
15

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y algunas de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.  
20

Los fragmentos "Fv monocatenario" o "Fvmc" del anticuerpo comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv además comprende un engarce polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que permite al Fvmc formar la estructura deseada para la unión antigénica. Para una revisión del Fvmc, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).  
25

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión antigénica. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los restos "marco conservados" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.  
30  
35  
40

Los "mamíferos" con propósitos de tratamiento se refieren a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, los destinados al deporte, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. Preferentemente el mamífero es un ser humano.  
45

Los términos "cáncer", "canceroso", y "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer microcítico pulmonar, cáncer no microcítico pulmonar, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, gástrico o cáncer de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer estromal gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepático y hepatoma), cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma de células basales, cáncer testicular, cáncer de esófago, carcinoma hepático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, mesotelioma, mieloma múltiple, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como el linfoma de células B (incluyendo linfoma no Hodgkin (LNH) folicular /de grado bajo; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH folicular/de grado intermedio; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); Linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica, y trastorno linfoproliferativo después de un trasplante (TLDT), así como la proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.  
50  
55  
60  
65

- Los términos “vascular” y “cardiovascular” se usan indistintamente y describen pacientes como indicios que estimulan la angiogénesis y/o la cardiovascularización, y aquellos que inhiben la angiogénesis y/o cardiovascularización. Dichos trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedades arteriales tales como, aterosclerosis, hipertensión, vasculitis inflamatoria, enfermedad de Reynaud y fenómeno de Reynaud, aneurismas y restenosis arterial, trastornos venosos y linfáticos tales como tromboflebitis, linfangitis y linfedema, y otros trastornos vasculares tales como enfermedad vascular periférica, AMD, cánceres tales como tumores vasculares, por ejemplo, hemangioma (capilar y cavernoso), tumores glómicos, telangiectasia, angiomas bacilar, hemangioendotelioma, angiosarcoma, hemangiopericitoma, sarcoma de Kaposi, linfangioma y linfangiosarcoma, angiogénesis tumoral, traumatismos tales como heridas, quemaduras, y otras lesiones tisulares, fijación de implantes, cicatrización, lesión por isquemia-reperfusión, artritis reumatoide, enfermedad cerebrovascular, enfermedades renales tales como insuficiencia renal aguda, y osteoporosis. Esto también incluiría la angina de pecho, infarto de miocardio, así como infartos agudos de miocardio, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca, así como insuficiencia cardíaca congestiva (CHF).
- El término "diabetes" se refiere a una enfermedad progresiva del metabolismo de los carbohidratos que implica una producción o utilización inadecuada de la insulina y se caracteriza por hiperglucemia y glucosuria. Este término incluye todas las formas de diabetes, tales como diabetes de tipo I y de tipo II y la diabetes resistente a la insulina, tales como Síndrome de Mendenhall, Síndrome de Werner, leprecaunismo, diabetes lipoatrófica y otras lipoatrofias.
- La expresión “purificado por afinidad” se refiere a purificar una sustancia por elución de esta a través de una columna de cromatografía por afinidad.

#### ELISA

- El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una glicoproteína homodimérica y es un factor angiogénico fundamental en la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo y en angiogénesis patológica asociada a tumores. La expresión de VEGF se potencia en respuesta a hipoxia, y potencialmente a otros factores tales como factores de crecimiento, hormonas y oncogenes, (véase, *por ejemplo*, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 25: 581-611 (2004)). El gen del VEGF humano tiene ocho exones separados por intrones. El corte y empalme alternativo del ARN da como resultado la generación de al menos cuatro isoformas principales cuyos monómeros tienen 121, 165, 189 y 206 aminoácidos (véanse, *por ejemplo*, Houck KA, et al.; The vascular- endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814 (1991); y, Tischer E, et al.; The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266: 11947-11954 (1991)). También se ha informado de isoformas menos frecuentes que incluyen aquellas cuyos monómeros tienen 145 (véase, *por ejemplo*, Poltorak Z., et al.; VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272: 7151-7158 (1997)) y 183 (véase, *e.g.*, Jingjing L, et al.; Human Muller cells express VEGF183. a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:752-759 (1999)) aminoácidos. Todas las isoformas de VEGF se unen a dos tirosina quinasas receptoras, VEGFR-1 (véase, *por ejemplo*, De Vries C, et al.; The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991 (1992)) y VEGFR-2 (véase, *por ejemplo*, Terman BI, et al.; Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6:1677-1683 (1991)). El VEGF<sub>165</sub> también interacciona con neuropilina (véase, *por ejemplo*, Soker S. et al.; Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745 (1998)). El VEGF<sub>189</sub> y el VEGF<sub>206</sub> se unen a heparina con una alta afinidad y se secuestran mayoritariamente en la matriz extracelular (MEC). El VEGF<sub>165</sub> se une a heparina con afinidad intermedia y es parcialmente soluble y se une parcialmente a la superficie celular y a la MEC. El VEGF<sub>121</sub> no se une a heparina y es fácilmente soluble. Mediante análisis por PCR de transcripción reversa se encontró que el VEGF<sub>121</sub> y el VEGF<sub>165</sub> eran las variantes más predominantemente expresadas en especímenes de tumores de cáncer de mama y de ovario y en líneas celulares, mientras que no se detectó la expresión de VEGF<sub>206</sub>. Se encontró que la expresión de VEGF<sub>183</sub> y VEGF<sub>189</sub> no era detectable o lo era a bajos niveles en las líneas celulares y se detectó en algunos de los especímenes de tumores (véase, *por ejemplo*, Stimpfl M, et al.; Vascular Endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 8: 2253-2259 (2002)).
- El fragmento activo de VEGF puede liberarse del VEGF unido a MEC por escisión con plasmina, generando los primeros 110 aminoácidos (véase, *por ejemplo*, The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem*. 271: 7788-7795 (1996)). Este podría ser un mecanismo para regular localmente la biodisponibilidad de VEGF durante los procesos fisiológicos y patológicos de la angiogénesis. Véanse, *por ejemplo*, Houck KA, et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-26037 (1992); Keyt BA, et al. The carboxy-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem*. 271:7788-7795 (1996); y, Roth D, et al. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am Pathology* 168: 670-684. (10-12) (2006). Sin embargo, en muestras biológicas no se han descrito concentraciones de VEGF<sub>110</sub>. También pueden liberarse fragmentos activos de VEGF de VEGF unido a la MEC por escisión con metaloproteinasas de la matriz (MMP). Esto se confirma por el hallazgo de fragmentos degradados de VEGF con aminoácidos adicionales en 1-110 en líquido ascítico de pacientes con cáncer



de ovario. Se detectaron tanto plasmina como MMP3, en líquido ascítico. Véase por ejemplo, Lee S, Shahla MJ, et al. Processing of VEGF-A by matrix metallo-proteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. J Cell Biology 169:681-691 (2005).

5 Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para varios antígenos incluyen aquellos basados en colorimetría, quimioluminiscencia y fluorimetría. Los ELISA se han aplicado con éxito en la determinación de cantidades bajas de fármacos y otros componentes antigénicos en muestras de plasma y orina, no implican etapas de extracción y son sencillos de realizar. El ensayo descrito en el presente documento, es un ELISA que utiliza anticuerpos como reactivos de captura y anticuerpos detectables para VEGF y VEGF<sub>110</sub>. En determinadas realizaciones, el ELISA está basado en células. En la primera etapa del ensayo la muestra biológica que se sospecha que contiene VEGF o que contiene VEGF<sub>110+</sub> se pone en contacto y se incuba con los anticuerpos de captura (o de recubrimiento) de forma que los anticuerpos de captura capturan o se unen al VEGF o al VEGF<sub>110+</sub> de forma que pueden detectarse en una etapa de detección. La etapa de detección implica el uso del anticuerpo detectable, que, cuando se pone en contacto con cualquiera de VEGF o VEGF<sub>110+</sub>, se une a la proteína de interés, si está presente, y se utiliza un medio de detección para detectar el marcador en el anticuerpo y por lo tanto la presencia o cantidad de VEGF o VEGF<sub>110+</sub> presente. Este ELISA puede compararse con un ELISA que reconoce VEGF total (por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 6.855.508; aquellos descritos en el presente documento, y aquellos conocidos en la técnica) o isoformas de VEGF para determinar el tipo de VEGF presente.

20 Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el ensayo utiliza las siguientes etapas.

#### Primera etapa

25 En la primera etapa del ensayo del presente documento, la muestra biológica se pone en contacto y se incuba con el reactivo de captura (o de recubrimiento) inmovilizado, que es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF. Este anticuerpo puede ser de cualquier especie, pero preferentemente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino o de rata, más preferentemente murino y lo más preferentemente el MAb 5C3 que deriva del hibridoma identificado en el presente documento. De este modo, en una realización específica preferida, el anticuerpo monoclonal inmovilizado es un anticuerpo monoclonal murino, lo más preferentemente MAb 5C3. La inmovilización se realiza de manera convencional insolubilizando el reactivo de captura, bien antes del procedimiento del ensayo, por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Patente de Estados Unidos N° 3.720.760) o por acoplamiento covalente o no covalente (por ejemplo, usando entrecruzamiento con glutaraldehído o carbodiimida, con o sin activación previa del soporte, por ejemplo, con ácido nítrico y un agente reductor tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 3.645.852 o en Rotmans et al. J. Immunol. Methods 57:87-98 (1.983)), o después, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

30 La fase sólida usada para la inmovilización puede ser cualquier soporte inerte o transportador que sea esencialmente insoluble en agua y útil en ensayos inmunométricos, que incluyen soportes en forma de, por ejemplo, superficies, partículas, matrices porosas, etc. Los ejemplos de soportes de uso común incluyen láminas pequeñas, Sephadex, cloruro de polivinilo, perlas de plástico, y placas de ensayo o tubos de ensayo fabricados con polietileno, polipropileno, poliestireno, y similares, que incluyen placas de microtitulación de 96 pocillos, así como materiales particulados tales como papel de filtro, agarosa, dextrano reticulado y otros polisacáridos. De forma alternativa, se emplean matrices reactivas insolubles en agua, tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de Estados Unidos Nos 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 de forma apropiada para la inmovilización del reactivo de captura. En una realización, el reactivo de captura inmovilizado recubre una placa de microtitulación, y en particular la fase sólida preferida es una placa de microtitulación de pocillos múltiples que puede utilizarse para analizar varias muestras al mismo tiempo, por ejemplo, una placa de microensayo ELISA de 96 pocillos tal como la que se comercializa como Nunc Maxisorb o Immulon. En determinadas realizaciones, la placa es una placa ELISA de 96 pocillos MICROTTEST™ o MAXISORB™, tal como las que se comercializan como NUNC MAXISORB™ o IMMULON™.

35 La fase sólida está recubierta con el reactivo de captura tal como se define anteriormente, que puede unirse mediante una interacción covalente o no covalente o unión física, según se desee. Las técnicas para la adhesión incluyen aquellas que se describen en la patente de Estados Unidos N° 4.376.110 y en las referencias que se citan en el presente documento. Si la interacción es covalente, la placa u otra fase sólida se incuba con un agente reticulante junto con el reactivo de captura en condiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como durante 1 hora a temperatura ambiente.

40 Los agentes reticulantes que se usan comúnmente para unir el reactivo de captura con el sustrato en fase sólida incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido-salicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis-(succinimidil-propionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio] propioimidato producen productos intermedios fotoactivables capaces de formar reticulaciones en presencia de luz.

65

Si se utilizan placas de 96 pocillos, que están normalmente recubiertas con el reactivo de captura (normalmente diluido en un tampón tal como carbonato de sodio 0,05 M por incubación durante al menos aproximadamente 10 horas, más preferentemente al menos durante una noche, a temperaturas de aproximadamente 4-20 °C, o aproximadamente 4-8 °C, y a un pH de aproximadamente 8-12, o aproximadamente pH 9-10, o aproximadamente pH 9,6). Si se desean tiempos de recubrimiento más cortos, se pueden recubrir, por ejemplo, placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante dos horas. Las placas pueden apilarse y recubrirse mucho antes al propio ensayo, y después el ensayo puede llevarse a cabo en varias muestras simultáneamente de modo manual, semi-automático, o automático, tal como utilizando robótica.

Después, las placas recubiertas se tratan normalmente con un agente bloqueante que se une de manera inespecífica y satura los sitios de unión para evitar la unión no deseada del ligando libre a los sitios sobrantes de los pocillos de la placa. Los ejemplos de agentes bloqueantes adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, gelatina, albúmina de suero bovino, albúmina de huevo, caseína y leche desnatada. El tratamiento de bloqueo normalmente tiene lugar en condiciones de temperatura ambiente durante aproximadamente 1-4 horas, preferentemente durante aproximadamente 1 a 3 horas, o durante una noche a 0-4 °C.

Después del recubrimiento y el bloqueo, se añade el patrón de VEGF (VEGF purificado) o la muestra biológica a analizar, adecuadamente diluida, a la fase inmovilizada. La tasa de dilución preferida es de aproximadamente 1-15 %, preferentemente de aproximadamente 10 %, en volumen. Los tampones que pueden utilizarse para la dilución para este propósito incluyen (a) PBS que contiene BSA al 0,5 %, detergente TWEEN 20™ (P20) al 0,05 %, antibiótico PROCLIN™ 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, tensioactivo de Chaps al 0,25 %, beta-gamma globulina al 0,2 %, y NaCl 0,35 M, pH 7,4; (b) PBS que contiene albúmina de suero bovino al 0,5 %, polisorbato 20 al 0,05 %, EDTA 5 mM, CHAPS al 0,25 %,  $\gamma$  globulinas bovinas al 0,2 %, y NaCl 0,35 M; pH 7,4; (c) PBS que contiene BSA al 0,5 %, polisorbato 20 (P20) al 0,05 %, y PROCLIN™ 300 al 0,05 %, pH 7; (d) PBS que contiene BSA al 0,5 %, P20 al 0,05 %, PROCLIN™ 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, y NaCl 0,35 M, pH 6,35; (e) PBS que contiene BSA al 0,5 %, P20 al 0,05 %, PROCLIN™ 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, beta-gamma globulina al 0,2 %, y NaCl 0,35 M, pH 7,4; y (f) PBS que contiene BSA al 0,5 %, P20 al 0,05 %, PROCLIN™ 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, CHAPS al 0,25 %, y NaCl 0,35 M, pH 7,4. El PROCLIN™ 300 actúa como un conservante, y el Tween 20™ actúa como un detergente para eliminar la unión no específica.

Mientras la concentración de los reactivos de captura generalmente se determinará por el intervalo de concentración de interés del VEGF teniendo en cuenta cualquier dilución necesaria de la muestra biológica, la concentración final del reactivo de captura se determinará normalmente de forma empírica para maximizar la sensibilidad del ensayo por encima del intervalo de interés.

Las condiciones de incubación de la muestra y del reactivo de captura inmovilizado se seleccionan para maximizar la sensibilidad del ensayo y para minimizar la disociación. Preferentemente, la incubación se realiza a temperaturas bastante constantes, que varían de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente de aproximadamente 20 °C a 25 °C. El tiempo de incubación depende principalmente de la temperatura, siendo generalmente no superior a aproximadamente 10 horas para evitar un ensayo insensible. Preferentemente, el tiempo de incubación es de aproximadamente 0,5 a 3 horas, y más preferentemente 1,5-3 horas a temperatura ambiente para maximizar la unión de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF libre a los reactivos de captura. La duración de la incubación puede prolongarse si se añade un inhibidor de proteasas para prevenir que las proteasas del fluido biológico degraden el VEGF.

En esta fase, el pH de la mezcla de incubación estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 4-9,5, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 6-9, más preferentemente aproximadamente 7-8, y más preferentemente el pH del diluyente del ensayo (ELISA) es un pH de 7,4. El pH del tampón de incubación se selecciona para mantener un nivel significativo de unión específica del reactivo de captura para que el VEGF<sub>110+</sub> o el VEGF se capturen. Se pueden emplear diversos tampones para alcanzar y mantener el pH deseado durante esta etapa, incluidos borato, fosfato, carbonato, Tris-HCl o Tris-fosfato, acetato, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para la invención, pero en ensayos individuales se puede preferir un tampón sobre otro.

#### Segunda etapa

En la segunda etapa del método de ensayo del presente documento, que es opcional, la muestra biológica se separa (preferentemente por lavado) del reactivo de captura inmovilizado para eliminar las moléculas no capturadas. La solución usada para el lavado generalmente es un tampón ("tampón de lavado") con un pH determinado utilizando las consideraciones y tampones que se describen anteriormente para la etapa de incubación, con un intervalo de pH preferente de aproximadamente 6-9. El lavado debe realizarse tres o más veces. La temperatura de lavado va generalmente desde la de refrigeración, hasta temperaturas moderadas, con una temperatura que se mantiene constante durante el periodo del ensayo, normalmente de aproximadamente 0-40 °C; más preferentemente de aproximadamente 4-30 °C. Por ejemplo, el tampón de lavado se puede colocar en hielo a 4 °C en un depósito antes del lavado, y en esta etapa se puede utilizar un lavaplacas. En esta fase se puede añadir también un agente reticulante u otro agente apropiado para permitir que el VEGF<sub>110+</sub> o el VEGF ahora unido se una covalentemente al reactivo de captura si existe algún interés de que el VEGF<sub>110+</sub> o el VEGF capturado pueda disociarse hasta cierto

grado en las etapas posteriores.

#### Tercera etapa

5 En la siguiente etapa, el reactivo de captura inmovilizado se pone en contacto con anticuerpos detectables, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 20-40 °C; más preferentemente aproximadamente 20-25 °C, con la temperatura y el tiempo exactos para ponerlos a los dos en contacto dependiendo fundamentalmente del medio de detección empleado. Por ejemplo, cuando se utiliza estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'-tetrametil benzidina como medio de detección, por ejemplo, en una realización, el contacto se realiza (por ejemplo, durante 10 aproximadamente 1 hora o más) para amplificar la señal al máximo. Preferentemente se añade un exceso molar de un anticuerpo con respecto a la concentración máxima de VEGF<sub>110+</sub> y VEGF libre esperada a la placa después lavarla (tal como se describe anteriormente). Este anticuerpo es directa o indirectamente detectable. Mientras que el anticuerpo detectable puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, por ejemplo, en determinadas realizaciones es un anticuerpo monoclonal, en una realización murino, y en una realización MAb A6.4.1. Además, el anticuerpo 15 detectable puede ser directamente detectable, y en una realización tiene un marcador colorimétrico, y en otra realización tiene un marcador fluorimétrico. Más preferentemente, el anticuerpo detectable está biotinilado y el medio de detección es avidina o estreptavidina-peroxidasa y 3,3', 5,5'-tetrametil benzidina. La lectura del medio de detección puede ser colorimétrica o fluorimétrica. La afinidad del anticuerpo debe ser lo suficientemente alta para que se puedan detectar pequeñas cantidades de VEGF<sub>110+</sub> o de VEGF libre, pero no tan alta como para producir la 20 extracción de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF de los reactivos de captura.

#### Cuarta etapa

25 En la última etapa del método del ensayo, el nivel de VEGF libre que ahora está unido al reactivo de captura se mide usando un medio de detección para el anticuerpo detectable. Si la muestra biológica es de un paciente con enfermedad vascular, diabético o con cáncer, la etapa de medición comprende preferentemente comparar la reacción que se produce como resultado de las tres etapas anteriores con una curva patrón para determinar el nivel de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF en comparación con un individuo normal, o preferentemente comprende comparar la reacción que se produce como resultado de las tres etapas anteriores con otro ELISA VEGF que reconoce diferentes 30 isoformas de VEGF total para determinar el nivel de los tipos de VEGF cuando se comparan los ELISA, y opcionalmente en comparación con un individuo normal.

#### Producción de anticuerpos

35 Los anticuerpos policlonales para el VEGF generalmente se suscitan en animales por inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de VEGF y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el VEGF o un fragmento que contenga la secuencia de aminoácidos diana con una proteína que sea inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa americana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de semilla de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), 40 glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub>, o R1N = C = NR, donde R y R1 son grupos alquilo diferentes.

45 Los anticuerpos usados como el recubrimiento o los anticuerpos detectables pueden obtenerse de cualquier fuente de vertebrados conveniente, tal como murina, primates, lagomorfos, cabra, conejo, rata, pollo, bovina, ovina, equina, canina, felina o porcina. También pueden emplearse anticuerpos quiméricos o humanizados, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); Neuberger et al. Nature 312: 604 (1984); Takeda et al. Nature 314:452 (1985); y en el documento WO 98/45331 publicado el 15 de octubre de 1998, así como en las referencias adicionales indicadas anteriormente.

50 Los animales pueden inmunizarse contra los conjugados inmunogénicos o derivados combinando 1 mg o 1 µg de conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde los animales se vacunan de nuevo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de conjugado en adyuvante incompleto de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días más tarde los animales se desangran y el título de anti-VEGF se ensaya en suero. 55 Los animales se vacunan de nuevo hasta que el título se estabiliza. Preferentemente, el animal se vacuna de nuevo con el conjugado de VEGF, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un agente reticulante diferente. Los conjugados también se pueden preparar en cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. También, se utilizan agentes agregantes como el alumbre para mejorar la respuesta inmunitaria. Los métodos para la producción de anticuerpos policlonales se describen en numerosos libros de texto de inmunología, tales como Davis et al. Microbiology, 3ª Edición, (Harper & Row, Nueva York, Nueva York, 1980). 60

Los anticuerpos monoclonales se preparan recuperando esplenocitos de animales inmunizados e inmortalizando las células de manera convencional, por ejemplo, por fusión con células de mieloma o transformación con el virus de Epstein-Barr, y exploración de clones que expresan el anticuerpo deseado. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein Eur. J. Immunol. 6:511 (1976). Los anticuerpos monoclonales, o la región de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal, tales como fragmentos Fab o (Fab)<sub>2</sub>, como alternativa, pueden producirse por métodos recombinantes. 65

Los ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen aquellos ya utilizados en RIA conocidos para la proteína en cuestión, por ejemplo, aquellos anticuerpos dirigidos contra VEGF tal como se describe en las referencias proporcionadas en la introducción del presente documento.

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF 5C3, que es obtenible a partir de o producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número PTA-7737, se utiliza, opcionalmente con otro anticuerpo anti-VEGF, A4.6.1. La invención también puede usar un anticuerpo que no se une al VEGF 1-110 y se une al mismo epítipo de VEGF<sub>110+</sub> que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma PTA-7737. Se proporciona un hibridoma 5C3.1.1 depositado en la ATCC con número de depósito PTA-7737.

10

#### Detección

15 El anticuerpo que se añade a los reactivos de captura inmovilizados, se marcará bien directamente, o se detectará indirectamente por la adición, después de separar por lavado el exceso del primer anticuerpo, de un exceso molar de un segundo anticuerpo marcado dirigido contra la IgG de la especie animal del primer anticuerpo. En este último ensayo indirecto, a la muestra se añaden antisueros marcados contra el primer anticuerpo para producir el anticuerpo marcado *in situ*.

20 El marcador usado para el primer o segundo anticuerpo es cualquiera que sea funcionalmente detectable que no interfiera con la unión de VEGF<sub>110+</sub> o de VEGF libre al anticuerpo. Los ejemplos de marcadores adecuados son aquellos numerosos marcadores conocidos para su uso en inmunoensayos, que incluyen restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromos, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que para detectarse deben reaccionar o derivatizarse. Ejemplos de dichos marcadores incluyen los radioisótopos, <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>131</sup>I y fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidosacaridasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/estreptavidina-β-galactosidasa con MUG, marcadores de spin, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares. Como se señaló anteriormente, la detección fluorimétrica es un ejemplo.

35 Se dispone de métodos convencionales para unir estos marcadores de forma covalente a las proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, pueden utilizarse agentes de acoplamiento tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidias, bisimidatos, bisbenzidinas, diazotizadas, y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. N° 3.940.475 (fluorimetría) y N° 3.645.090 (enzimas); Hunter et al., Nature 144:945 (1962); David et al. 13:1014-1021 Biochemistry (1974); Pain et al. J. Immunol. Methods 40:219-230 (1981); y Nygren J. Histochem; y Cytochem. 30:407-412 (1982). En determinadas realizaciones, los marcadores de la presente invención son fluorescentes para aumentar la amplificación y la sensibilidad a 8 pg/ml, más preferentemente biotina con estreptavidina-β-galactosidasa y MUG para amplificar la señal. En determinadas realizaciones, se utiliza un marcador colorimétrico, por ejemplo, donde el anticuerpo detectable está biotinilado y el medio de detección es avidina o estreptavidina-peroxidasa y 3,3', 5,5'-tetrametil benzidina.

45

La conjugación de dichos marcadores, incluidas las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento de manipulación convencional para un experto en las técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 1981), págs 147-166.

50

Tras añadir el último anticuerpo marcado, la cantidad de anticuerpo unido se determina eliminando el exceso de anticuerpo marcado no unido mediante lavado y después, midiendo la cantidad de marcador unido usando un método de detección apropiado para el marcador, y correlacionando la cantidad medida con la cantidad de VEGF<sub>110+</sub> o VEGF libre en la muestra biológica. Por ejemplo, en el caso de enzimas, la cantidad de color que se revela y se mide será una medida directa de la cantidad del VEGF<sub>110+</sub> o VEGF presente. Específicamente, si el marcador es HRP, el color se detecta utilizando el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametil benzidina a una absorbancia de 450 nm.

55 En un ejemplo, después de lavar de la fase inmovilizada un segundo anticuerpo marcado con una enzima dirigido contra el primer anticuerpo no marcado, se revela el color o se mide la quimioluminiscencia incubando el reactivo de captura inmovilizado con un sustrato de la enzima. Después se calcula la cantidad de concentración de VEGF<sub>110+</sub> libre o VEGF comparando con el color o la quimioluminiscencia generados por el procesamiento en paralelo del patrón VEGF.

60

## Kits

De acuerdo con la invención, el método de ensayo de esta divulgación se proporciona en forma de un kit. Dicho kit es una combinación de envasado que incluye los elementos básicos de:

- 5 (a) reactivo de captura compuesto por el anticuerpo monoclonal contra la molécula de VEGF humano, en donde el anticuerpo monoclonal reconoce a VEGF<sub>110+</sub>; y  
 10 (b) reactivos de detección que comprenden anticuerpos detectables (marcados o no marcados) que se unen a los dominios de unión de los receptores KDR y FLT1 de VEGF. Estos elementos básicos se definen anteriormente en el presente documento. En determinadas realizaciones, los reactivos de detección comprenden un anticuerpo detectable (o anticuerpos detectables) que se unen al epítipo de VEGF1-110.

Preferentemente, el kit comprende además un soporte sólido para los reactivos de captura, que puede proporcionarse como un elemento distinto o en el que los reactivos de captura ya están inmovilizados. Por tanto, los anticuerpos de captura en el kit pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido, o pueden inmovilizarse sobre dicho soporte que se incluye con el kit o proporcionarse por separado del kit.

Preferentemente, los reactivos de captura recubren una placa de microtitulación. El reactivo de detección puede ser anticuerpos marcados directamente o anticuerpos no marcados que detectan los anticuerpos marcados dirigidos contra los anticuerpos no marcados suscitados en una especie diferente. Cuando el marcador es una enzima, el kit incluirá normalmente sustratos y cofactores requeridos por la enzima, y donde el marcador es un fluoróforo, un precursor de colorante que proporciona el cromóforo detectable. Cuando el reactivo de detección no está marcado, el kit también puede comprender un medio de detección para los anticuerpos detectables, tales como los anticuerpos marcados dirigidos contra los anticuerpos no marcados, preferentemente en un formato de detección fluorimétrica. Cuando el marcador es una enzima, el kit incluirá normalmente sustratos y cofactores requeridos por la enzima, donde el marcador es un fluoróforo, un precursor de colorante que proporciona el cromóforo detectable, y donde el marcador es biotina, una avidina tal como avidina, estreptavidina, o estreptavidina conjugada con HRP o  $\beta$ -galactosidasa con MUG.

En una realización específica, el reactivo de captura es un anticuerpo monoclonal, preferentemente de roedor, más preferentemente murino o de rata, aún más preferentemente murino y lo más preferentemente el MAb 5C3. Asimismo, en determinadas realizaciones, el anticuerpo detectable es un anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo monoclonal es de roedor, más preferentemente murino o de rata, aún más preferentemente murino, aún más preferentemente MAb A4.6.1. En determinadas realizaciones, el reactivo de captura se inmoviliza en este kit.

En determinadas realizaciones, el kit puede contener múltiples ELISA para estudios de comparación para la detección de diversas formas de VEGF y VEGF<sub>110+</sub> tal como como se describe en el presente documento.

El kit también contiene normalmente instrucciones para llevar a cabo el ensayo, y/o VEGF como patrón de antígeno (por ejemplo, VEGF purificado, preferentemente VEGF producido de modo recombinante, y VEGF110), así como otros aditivos tales como estabilizadores, tampones de lavado y de incubación, y similares.

Los ejemplos de patrones para VEGF son los VEGF humanos recombinantes producidos en células de mamífero disponibles de Genentech, Inc., South San Francisco, California, y de aquellas empresas y procedimientos descritos en el presente documento.

Los componentes del kit se proporcionan en proporciones predeterminadas, con las cantidades relativas de los diversos reactivos variados adecuadamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que maximizan substancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes, que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada para combinar con la muestra a ensayar.

**Depósito de Materiales**

El siguiente material se ha depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110-2209, Estados Unidos (ATCC):

El hibridoma 5C3.1.1 se depositó en la ATCC con el número de acceso PTA-7737 depositado el 19 de julio de 2006.

Hibridoma	N ° de Acceso en la ATCC	Fecha de depósito
5C3.1.1	PTA-7737	19 de julio de 2006
A4.6.1	HB 10709	29 de marzo de 1991.

El depósito se hizo en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con la finalidad del Procedimiento de Patentes y su Reglamento (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los depósitos serán puestos a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y serán sometidos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegura la disponibilidad al público, permanente y sin restricciones, de la progenie del cultivo del depósito tras la publicación de la patente pertinente de los Estados Unidos o tras abrir al público de cualquier solicitud de patente de los Estados Unidos o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos para tener derecho a este de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de acuerdo con el Comisionado (incluyendo 37 CFR § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito pereciese o se perdiese o se destruyese cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales serán reemplazados con prontitud por otros iguales, previa notificación. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para el uso práctico de la invención contraviniendo los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Se considera que la memoria descriptiva es suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La invención no debe limitarse en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser únicamente una ilustración de determinados aspectos de la invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente se encuentra dentro del alcance de la invención. El depósito de material del presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita sea inadecuada para permitir la puesta en práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe entenderse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, se harán evidentes para los expertos en la materia varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son para fines únicamente ilustrativos.

## Ejemplos

Ejemplo 1:

Se sabe que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se expresa como diferentes isoformas debido al corte y empalme alternativo del ARN, juega un papel clave en la angiogénesis tumoral. Se midieron las concentraciones de VEGF<sub>165</sub> y de VEGF total y se evaluó la cantidad relativa de VEGF<sub>110</sub>, que es un fragmento activo generado por digestión con plasmina de VEGF. Un *ELISA A* (ELISA VEGF<sub>165</sub>-206) detecta VEGF<sub>165</sub> e isoformas más grandes, pero no VEGF<sub>121</sub>. *ELISA B* (VEGF<sub>110</sub>-206 ELISA) detecta VEGF<sub>165</sub> e isoformas, VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>110</sub>. *ELISA C* (ELISA VEGF<sub>121</sub>-206) detecta VEGF<sub>165</sub> e isoformas más grandes, VEGF<sub>121</sub> y fragmentos de VEGF con un peso molecular mayor que el de VEGF<sub>110</sub>, pero no VEGF<sub>110</sub> (denominado como "VEGF<sub>110+</sub>" en el presente documento).

## Materiales y métodos

*Reactivos y células:* Se produjeron en *E. coli* VEGF<sub>165</sub> recombinante (Genentech), VEGF<sub>121</sub> (PeproTech, Rocky Hill, Nueva Jersey), VEGF<sub>8-109</sub> (que consiste en los aminoácidos 8-109 de VEGF<sub>165</sub>) y VEGF<sub>121</sub> truncado (R&D Systems, Minneapolis, MN). Según el fabricante, por espectrometría de masas, el VEGF<sub>121</sub> truncado tiene un extremo N intacto, pero tiene una masa de 26 kDa, coherente con el truncamiento de aproximadamente nueve aminoácidos desde el extremo carboxilo. Este migró entre VEGF<sub>110</sub> y VEGF<sub>121</sub> cuando se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se preparó VEGF<sub>110</sub> por digestión con plasmina de VEGF<sub>165</sub> (Keyt BA, et al.; the carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 271: 7788-7795 (1996)). El peso molecular medido por espectrometría de masas era de 25.390, que coincidía con la masa teórica de 25.389. La concentración se determinó usando el método del ácido bicinonínico (Pierce, Rockford, IL). Los pesos moleculares utilizados para calcular la concentración de VEGF<sub>8-109</sub>, VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> fueron de 23,8, 28,9 y 38,2 kDa, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales anti-VEGF A4.6.1, 3.5F8, 2E3 y 5C3 se generaron inmunizando ratones con VEGF<sub>165</sub> producido en células CHO (Kim KJ, et al.; The vascular endothelial growth factor proteins: Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 7: 53-64 (1992)). Se cultivaron líneas celulares de mama SK-BR-3, BT-474, T-47D y MCF-7, así como líneas celulares de ovario ES-2, OVCAR-3 y SK-OV-3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) en RPMI, L-glutamina 2 mM y FBS al 10 % (excepto 20 % para OVCAR-3) a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%.

*Purificación de VEGF en medios acondicionados de células A673:* se cultivaron células A673 (American Type Culture Collection,) en F12/DMEM 50:50, L-glutamina 2 mM y FBS al 5% a una confluencia del 60% y después en medio asérico (Genentech) hasta la confluencia. El VEGF se purificó de los sobrenadantes utilizando una columna

de Sefarosa A4.6.1 que se preparó con Sefarosa activada con CNBr (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). El eluato de la columna y los controles de VEGF recombinante (0,2 µg por carril) se procesaron en geles de Tris-Glicina al 18 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras y se transfirieron a nitrocelulosa. La transferencia se bloqueó con Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5, NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM, Tritón 100 al 0,5 % que contenía albúmina de suero bovino al 3 % y se exploró con 200 ng/ml de 3.5F8 o A4.6.1 seguido de 2 ng/ml de anti-Fc de ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch). Las señales se revelaron utilizando SuperSignal West Dura (Pierce) y se registraron en una película de rayos X.

#### Ensayos ELISA para VEGF para medir concentraciones de VEGF

**ELISA A** (ELISA VEGF165-206). A menos que se indique lo contrario, se usó un ELISA A fluorimétrico para medir VEGF en las muestras. El ELISA fluorimétrico A usó 3.5F8 para el recubrimiento y A4.6.1 biotinilado seguido de streptavidina-β galactosidasa para la detección y 4-metilumbeliferil-β-D galactósido como el sustrato (Rodríguez CR, et al.; A sensitive fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay that measures vascular endothelial growth factor 165 in human plasma. *J Immunol Methods* 219: 45-55 (1998)). Los patrones de VEGF<sub>165</sub> fueron 1-128 pg/ml, o 0,026-3,35 pM. El ELISA A colorimétrico usó 3.5F8 para el recubrimiento y A4.6.1 biotinilado para la detección, siguiendo el protocolo usado para el ELISA C descrito a continuación. Los patrones de VEGF<sub>165</sub> fueron 1,6-200 pg/ml.

**ELISA B** (ELISA VEGF110-206) (denominado anteriormente ELISA VEGF121-206, Konecny GE, et al.; Association between HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 10: 1706-1716 (2004)): Se recubrieron placas de micropocillos de 96 pocillos MaxiSorp con 0,5 µg/ml de anticuerpo A4.6.1 en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6 a 100 µl/pocillo a 4°C durante toda la noche. Después de esta etapa y entre las siguientes etapas de incubación a temperatura ambiente las placas se lavaron con PBS, pH 7,4, que contenía polisorbato 2 al 0,05%. Las placas se bloquearon con albúmina de suero bovino al 0,5%, Proclin™300 10 ppm (Supelco, Bellefonte, PA) en PBS (150 µl/pocillo) durante 1 h. Los patrones de VEGF (VEGF<sub>165</sub> 1,56-200 pg/ml o VEGF 0,0409-5,24 pM en dilución en serie de factor dos) y las muestras diluidas en serie (dilución mínima 1:10) en PBS, en dilución en serie de factor dos o tres, pH 7,4, que contiene albúmina de suero bovino al 0,5%, polisorbato 20 al 0,05%, EDTA 5 mM, CHAPS al 0,25%, γ-globulinas bovinas al 0,2% (Sigma, St. Louis, MO) y NaCl 0,35 M (tampón de muestra) se añadieron a las placas (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 2 h. El VEGF unido se detectó en las placas por incubación con 2E3 biotinilado (u otro anticuerpo que se une al dominio de unión al receptor de VEGF) durante 1 h seguido de estreptavidina-HRP (Amersham, Copenhagen, Dinamarca) durante 30 min, biotini-tiramida (ELAST ELISA amplification System, Perkin Elmer Life Sciences Inc., MA) durante 15 min y estreptavidina-HRP durante 30 min. Se añadió el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametil benzidina) (Kirkegaard & Perry Laboratories) y la reacción se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector apilador Titertek (ICN, Costa Mesa, CA). Las curvas de titulación se ajustaron usando un programa de regresión de cuatro parámetros de ajuste de curvas (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA). Los puntos de datos que se encontraban en el intervalo de la curva patrón se usaron para calcular las supuestas concentraciones de VEGF en las muestras. La recuperación de VEGF<sub>165</sub> 1,56 -200 pg/ml en plasma humano-EDTA al 10% (Golden West Biologicals Inc., Temecula, CA) fue de 92-120 % después restar el supuesto VEGF endógeno 2,1 pg/ml en el plasma al 10 % usado en este estudio.

**ELISA C** (VEGF121-206 ELISA): Se recubrieron placas de micropocillos con 1 µg/ml de anticuerpo anti-VEGF 5C3 y se bloquearon como se ha descrito anteriormente. Se añadieron a las placas patrones de VEGF (VEGF<sub>165</sub> 4,00-512 pg/ml o VEGF 0,105-13,4 pM en una dilución en serie de factor 2) y las muestras diluidas en serie en tampón de muestra. Se incubaron las placas durante 2 horas. El VEGF unido se detectó añadiendo A4.6.1 biotinilado seguido de estreptavidina-HRP y TMB como sustrato. Las placas se leyeron y los datos se analizaron como se ha descrito anteriormente: La recuperación de VEGF<sub>165</sub> 4,00-512 pg/ml en plasma al 10 % fue de 77-101 % después de restar el supuesto VEGF endógeno 1,6 pg/ml en el plasma al 10 % usado en este estudio.

#### Resultados y análisis

**Ensayos ELISA para VEGF:** El ELISA A anteriormente descrito, usa 3.5F8 para el recubrimiento y A4.6.1 biotinilado para la detección (Rodríguez CR, et al.; A sensitive fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay that measures vascular endothelial growth factor165 in human plasma. *J Immunol Methods* 219: 45-55, 1998). Detecta VEGF165 (VEGF<sub>165</sub>) pero no VEGF121(1) (VEGF<sub>121</sub>(1)), que es de R&D systems y carece de aproximadamente 9 aminoácidos del extremo carboxi, y VEGF121(2) (VEGF<sub>121</sub>(2)), que es de PeptoTech (**Fig. 1A**). El 3.5F8 se une a VEGF<sub>165</sub> pero no a VEGF<sub>121</sub> de BIAcore. El A4.6.1 se une al dominio de unión al receptor (Kim KJ, et al.; The vascular endothelial growth factor proteins: Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 7: 53-64, 1992) que está presente en todas las isoformas y en VEGF<sub>110</sub>. El 3.5F8 se une probablemente cerca de los aminoácidos 116 y 118, que no están presentes en VEGF<sub>121</sub>. El 5C3 se une probablemente cerca de los aminoácidos 111-113, que no están presentes en VEGF<sub>110</sub> (**Fig 3**). El ELISA A puede detectar probablemente isoformas de VEGF que contenían secuencias de VEGF<sub>165</sub> que incluyen VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> (véase, por ejemplo, Stimpfl M, et al.; Vascular Endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 8: 2253-2259, 2002). El ELISA B (denominado anteriormente) VEGF121-206 ELISA, Konecny GE, et al., Association between HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 10: 1706-1716,

- 2004) usa A4.6.1 para el recubrimiento y 2E3 biotinilado para la detección. A4.6.1 y 2E3 se unen al dominio de unión al receptor que está presente en las tres moléculas. Véanse, por ejemplo, Kim KJ, et al. The vascular endothelial growth factor proteins: Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 7:53-64 (1992); y, Muller YA, et al. 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). También se pueden utilizar otros anticuerpos que se unen a esas regiones. Este ELISA detecta VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>121</sub> truncado (que carece de aproximadamente 9 aminoácidos del extremo carboxi), VEGF<sub>110</sub> y VEGF<sub>8-109</sub> igualmente bien (**Fig. 1B**). Este ELISA puede detectar VEGF total, incluyendo fragmentos más grandes de VEGF<sub>110</sub> generados por digestión con metaloproteinasas de la matriz. El ELISA C, descrito en el presente documento, que usa 5C3 para el recubrimiento y A4.6.1 biotinilado para la detección, detecta VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, y VEGF<sub>121</sub> truncado igualmente bien pero no detecta VEGF<sub>110</sub> o VEGF<sub>8-109</sub> (**Fig. 1, C**). El 5C3 se une a VEGF<sub>121</sub> pero no a VEGF<sub>8-109</sub> de BIAcore. Este ELISA puede detectar todas las moléculas de VEGF detectadas por el VEGF<sub>110-206</sub> excepto VEGF<sub>110</sub> y fragmentos más pequeños.
- 15 Las sensibilidades de ELISA A, ELISA B y ELISA C fueron 10, 16 y 40 pg/ml de VEGF<sub>165</sub> (o 0,26, 0,41 y 1,05 pM para diferentes isoformas y fragmentos de VEGF) para VEGF en muestras usando una dilución mínima de 1:10, respectivamente. El ELISA B y el ELISA C fueron reproducibles (Tablas 1 y 2). El ELISA B y el ELISA C fueron específicos para VEGF (VEGF-A). VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D a concentraciones de hasta 50 ng/ml únicamente dieron señales de fondo. El factor de crecimiento insulínico 1, la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento nervioso recombinante, el factor de necrosis tumoral (Genentech), el factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, el factor de crecimiento placentario, el factor de crecimiento transformante β1 (R&D Systems) (hasta 200 ng/ml) solamente dieron señales de fondo. La heparina (Leo Laboratories, Bucks, RU y Dublín, Irlanda) (hasta 100 U/ml) no tuvo ningún efecto significativo sobre el ensayo.

Tabla 1. ELISA B (ELISA VEGF<sub>110-206</sub>): El intervalo patrón fue de 1,56-200 pg/ml para VEGF<sub>165</sub> (VEGF 0,0409-5,24 pM) en tampón. La proporción de la DO del patrón de 1,56 pg/ml en relación con el blanco fue de  $1,37 \pm 0,11$ . CV es el coeficiente de variación.

Control <sup>a</sup>	Media (pg/ml)	Inter %CV	Intra %CV
Bajo	3,07	17,7	13,5
Medio	38,0	9,50	6,54
Alto	127	9,11	6,95

<sup>a</sup>Los controles medio y alto se realizaron añadiendo VEGF<sub>165</sub> recombinante a plasma humano EDTA. El control bajo se realizó añadiendo VEGF<sub>165</sub> a plasma al 70 % ya que el plasma contenía VEGF endógeno. Los controles se diluyeron a 1:10 y se ensayaron por duplicado en 34 ensayos independientes.

25 Tabla 2. ELISA C (VEGF<sub>121-206</sub> ELISA). El intervalo patrón fue de 4,00-512 pg/ml para VEGF<sub>165</sub> (VEGF 0,105-13,4 pM). La proporción de la DO del patrón de 4 pg/ml en relación con el blanco fue de  $2,72 \pm 0,37$ . CV es el coeficiente de variación.

Control <sup>a</sup>	Media (pg/ml)	Inter %CV	Intra %CV
Bajo	3,28	20,6	8,35
Medio	11,7	6,56	2,39
Alto	56,5	2,57	1,37

<sup>a</sup> Los controles se realizaron añadiendo VEGF<sub>165</sub> recombinante a plasma humano EDTA. Los controles se diluyeron a 1:10 y se ensayaron por duplicado en 15 ensayos independientes.

- 30 *VEGF en medios acondicionados de líneas celulares:* Se midieron medios acondicionados de seis clones de CHO estables transfectados con ADNc de VEGF<sub>165</sub> (Meng et al., 2000) con los tres ELISA, en los que como patrón se usó VEGF no glicosilado producido en *E. coli*. El VEGF<sub>165</sub> recombinante glicosilado en medios acondicionados de seis clones de CHO estables produjo concentraciones muy similares en los tres ensayos ELISA. Las concentraciones medidas por ELISA B fueron 28, 63, 64, 43, 3,8 y 3,2 nM, respectivamente. Las relaciones de las concentraciones de VEGF medidas por ELISA A y ELISA C en comparación con las de ELISA B fueron  $0,90 \pm 0,08$  y  $1,08 \pm 0,10$ , respectivamente. Por lo tanto, los tres ensayos ELISA cuantificaron VEGF glicosilado igualmente bien y hubo poca proteólisis de VEGF<sub>165</sub> en las condiciones de cultivo.

- 35 Las concentraciones de VEGF en medio acondicionado de células A673 medidas por ELISA A, B ELISA y ELISA C fueron 0,15, 0,29 y 0,24 nM de VEGF, respectivamente. La concentración medida por el ELISA A fue menor, lo que indica que el VEGF<sub>121</sub> estaba presente. Cuando el VEGF se purificó del medio acondicionado utilizando una columna de afinidad para A4.6.1 y se analizó por transferencia de proteínas, se detectaron dos bandas, probablemente de VEGF<sub>165</sub> glicosilado y no glicosilado, mediante 3.5F8. La banda inferior tenía la misma movilidad que el VEGF<sub>165</sub> purificado producido en *E. coli* (**Fig. 2, izquierda**). El tratamiento con N-glicanasa convirtió la banda superior en la banda inferior. Se detectaron por A4.6.1 dos bandas adicionales de peso molecular inferior, probablemente de VEGF<sub>121</sub> glicosilado (que se superponen parcialmente con la banda del supuesto VEGF<sub>165</sub> no glicosilado) y no glicosilado (**figura 2, derecha**). La banda inferior tenía la misma movilidad que la del VEGF<sub>121</sub> purificado producido en *E. coli* y el tratamiento con N-glicanasa convirtió la banda superior en la banda inferior.



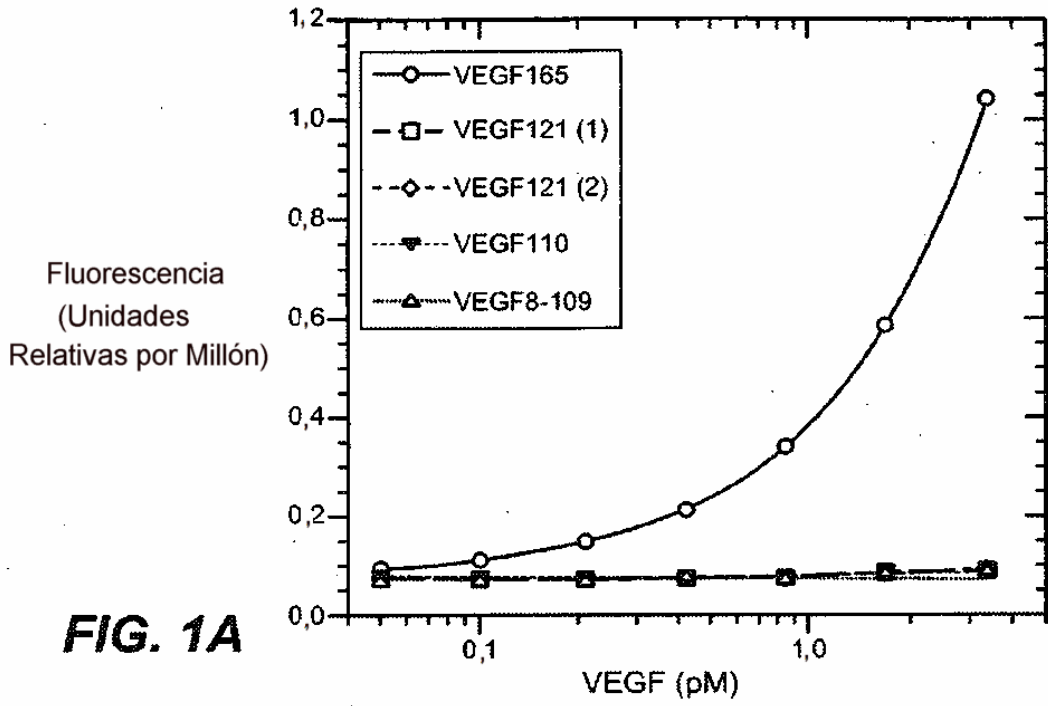
5 Las concentraciones de VEGF en medios acondicionados de líneas de células de mama SK-BR-3, BT-474, T-47D y MCF-7 medidas por el ELISA B fueron 3,6, 16, 13, y 13 pM, respectivamente. Las relaciones de las concentraciones de VEGF medidas por el ELISA de A y las medidas por el ELISA B fueron 0,49, 0,42, 0,43 y 0,38 (o 49, 42 %, 43 % o 38 %), respectivamente, de acuerdo con 43, 35, 40 y 41 % de expresión de VEGF<sub>165</sub> en estas líneas celulares respectivas (Stimpfl M, et al.: Vascular Endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 8: 2253-2259, 2002). Las relaciones de las concentraciones de VEGF medidas por el ELISA C con respecto a las medidas por el ELISA B fueron 1,1-1,2 en estas líneas celulares, lo que indica que había poco VEGF<sub>110</sub>. Las concentraciones de VEGF en medios acondicionados de líneas celulares de ovario ES-2, OVCAR-3 y SK-OV-3 medidas por el ELISA B fueron 32, 11 y 20 pM, respectivamente. Las relaciones de las concentraciones de VEGF medidas por el ELISA A con respecto a las medidas por el ELISA B fueron 0,24, 0,20, y 0,32 (o 24 %, 20 % y 32 %), respectivamente, en comparación con 38, 42 y 24 % de expresión de VEGF<sub>165</sub> en estas líneas celulares respectivas (Stimpfl et al, citado anteriormente). Las relaciones de las concentraciones de VEGF medidas por el ELISA C con respecto a las medidas por el ELISA B fueron 0,64-0,79 para estas líneas celulares, lo que indica que puede haber VEGF<sub>110</sub> (o fragmentos más pequeños).

10

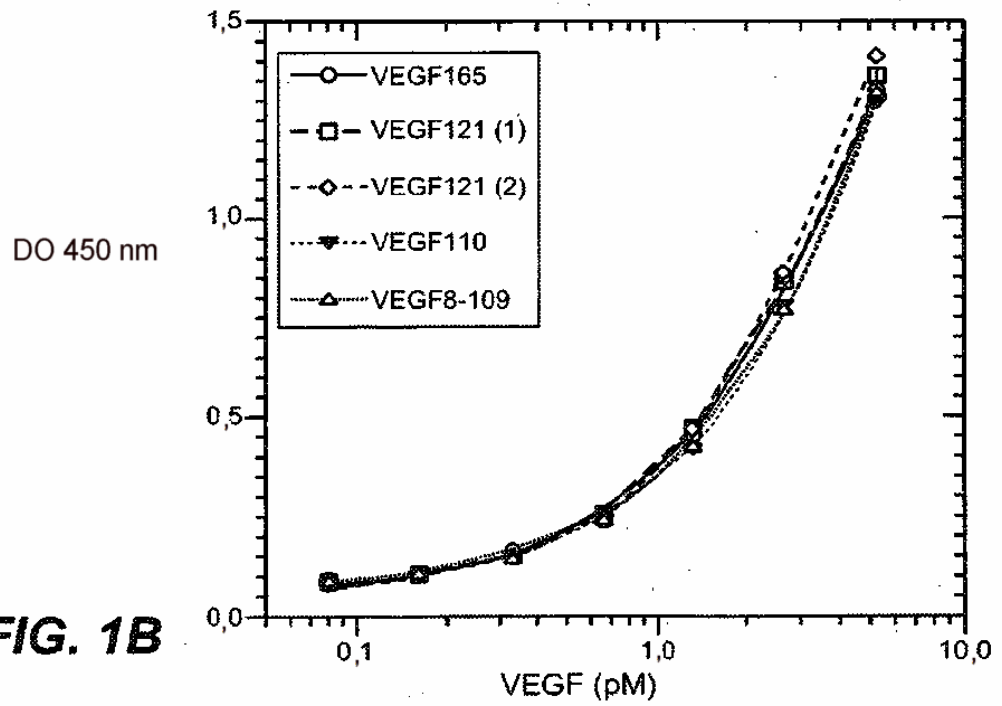
15

**REIVINDICACIONES**

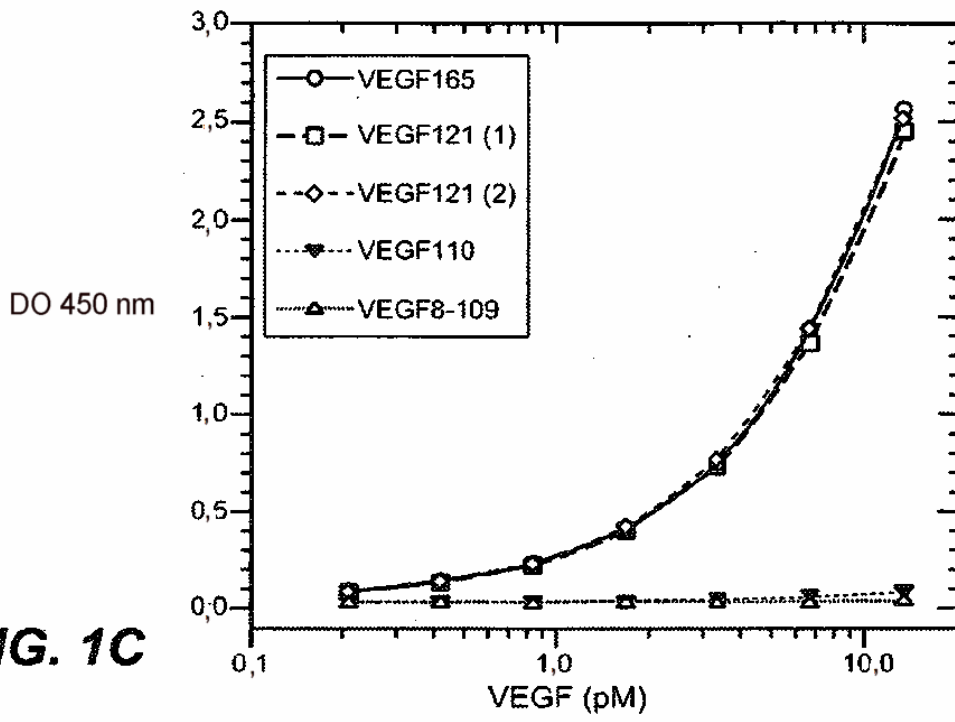
- 5 1. Un kit de anticuerpo-ELISA sándwich capaz de detectar de manera selectiva isoformas de VEGF y fragmentos de VEGF mayores de 110 aminoácidos desde el extremo N-terminal, incluyendo las isoformas VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub>, pero no VEGF<sub>110</sub>, en donde el kit comprende:
- 10 (a) un reactivo de captura que comprende un anticuerpo monoclonal contra VEGF humano, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de detectar específicamente isoformas de VEGF y fragmentos de VEGF mayores de 110 aminoácidos desde el extremo N-terminal, incluyendo VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub>, pero no VEGF<sub>110</sub>; y  
(b) reactivos de detección que comprenden un anticuerpo detectable, en donde el anticuerpo detectable es MAb A4.6.1, obtenible a partir del hibridoma A4.6.1 depositado en la ATCC con el número de referencia HB10709.
- 15 2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de captura es capaz de reconocer las formas de 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos de VEGF humano.
3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que además comprende un soporte sólido para el reactivo de captura.
- 20 4. El kit de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el soporte sólido se proporciona en forma de un elemento separado del kit.
5. El kit de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el reactivo de captura ya está inmovilizado en el soporte.
- 25 6. El kit de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el reactivo de captura se encuentra recubierto sobre una placa de microtitulación.
7. El kit de cualquier reivindicación anterior, que además comprende un medio de detección para los anticuerpos detectables.
- 30 8. El kit de la reivindicación 7, en donde el medio de detección es colorimétrico.
9. El kit de cualquier reivindicación anterior, que además comprende VEGGF purificado como patrón de antígeno.
- 35 10. El kit de cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo de captura es MAb 5C3, que puede obtenerse a partir del hibridoma 5C3.1.1 depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-7737.



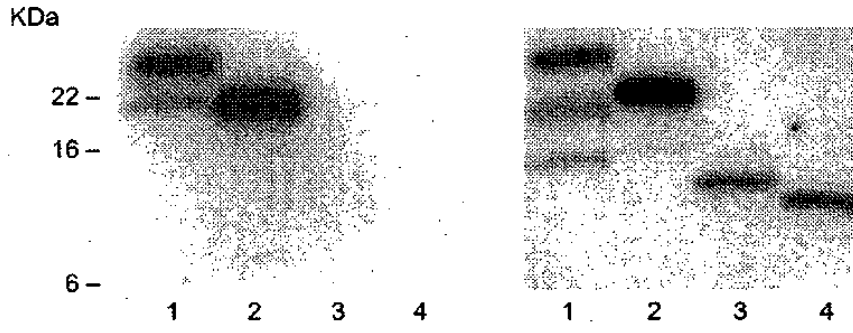
**FIG. 1A**



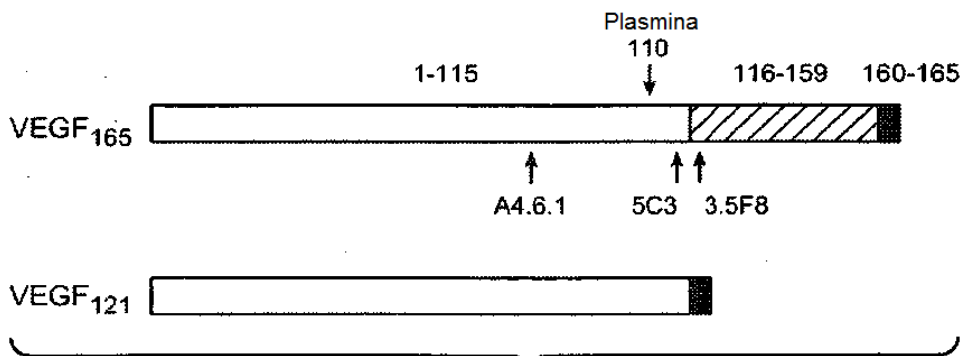
**FIG. 1B**



**FIG. 1C**



**FIG. 2**



**FIG. 3**