

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 350**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10798239 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2516465**

54 Título: **Anticuerpos anti Bv8 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**23.12.2009 US 284743 P**

**16.11.2010 US 414052 P**

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

**05.10.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**WU, XIUMIN;**  
**YU, LANLAN;**  
**LIANG, WEI-CHING;**  
**MENG, YU-JU G.;**  
**TIEN, JANET;**  
**WU, YAN y**  
**FERRARA, NAPOLEONE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 585 350 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti Bv8 y usos de los mismos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti Bv8 y a usos de los mismos.

## 10 Antecedentes de la invención

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

En el caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de la hiperplasia a la neoplasia, y para proporcionar alimentación para el crecimiento y metástasis del tumor. Folkman *et al.*, Nature, 339: 58 (1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con células normales. Un tumor habitualmente comienza como una única célula aberrante que puede proliferar solamente hasta un tamaño de algunos milímetros cúbicos debido a la distancia desde lechos capilares disponibles, y puede permanecer "dormida" sin crecimiento y diseminación adicional durante un periodo de tiempo largo. Algunas células tumorales cambian después al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos de nueva formación no solamente permiten el crecimiento continuado del tumor primario, sino que también permiten la difusión y recolonización de células tumorales metastásicas. En consecuencia, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones tumorales y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en varios otros tumores. Weidner *et al.*, N. Engl. J. Med, 324: 1-6 (1991); Horak *et al.*, Lancet, 340: 1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, Lancet, 340: 145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no se entienden bien, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral resulta del equilibrio neto de una multitud de estimulantes e inhibidores de la angiogénesis (Folkman, 1995, Nat Med 1 (1): 27-31).

El proceso de desarrollo vascular está estrechamente regulado. Hasta la fecha, se ha mostrado que un número significativo de moléculas, en su mayoría factores secretados producidos por células circundantes, regula la diferenciación, proliferación, migración y coalescencia de CE en estructuras de tipo cordón. Por ejemplo, se ha identificado el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como el factor clave implicado en la estimulación de la angiogénesis y en la inducción de permeabilidad vascular. Ferrara *et al.*, Endocr. Rev., 18: 4-25 (1997). El hallazgo de que la pérdida de incluso un único alelo de VEGF da como resultado letalidad embrionaria apunta a un papel irremplazable desempeñado por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Además, se ha mostrado que VEGF es un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara *et al.*, Endocr. Rev., mencionado anteriormente. El ARNm de VEGF está sobreexpresado por la mayoría de 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); Dvorak *et al.*, Am. J. Pathol., 146: 1029-1039 (1995).

Se ha mostrado que Bv8 induce proliferación, supervivencia y migración de células endoteliales capilares corticales adrenales (LeCouter, J. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100, 2685-2690 (2003)). Bv8 y EG-VEGF son dos proteínas secretadas altamente relacionadas, también denominadas prokineticina-1 y 2, que estructuralmente pertenecen a una clase mayor de péptidos definida por un motivo de cinco enlaces disulfuro denominado un pliegue de colipasa (DeCouter, J. *et al.*, Nature 420, 860-867 (2002); LeCouter, J. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100, 2685-2690 (2003); Li, M. *et al.*, Mol Pharmacol 59, 692-698 (2001)). Bv8 se identificó inicialmente como una proteína secretada de la piel de la rana *Bombina variegata* (Mollay, C. *et al.*, Eur J Pharmacol 374, 189-196 (1999)). La clonación y expresión de Bv8 se describen en el documento WO 03/020892 publicado el 13 de marzo de 2003. Bv8 y EG-VEGF se unen con dos receptores acoplados a proteína G altamente relacionados (GPCR), EG-VEGF/PKR-1 (R1) y EG-VEGF/PKR-2 (R2) (Masuda, Y *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 293, 496-402 (2002); Lin, D. C. *et al.*, J Biol Chem 277, 19276-19280 (2002)). EG-VEGF y Bv8 se caracterizaron como mitógenos selectivos para tipos celulares endoteliales específicos (LeCouter, J. *et al.*, Nature 412(6850): 877-84 (2001) y LeCouter, J. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100, 2685-2690 (2003)). Otras actividades se han atribuido a esta familia, incluyendo nocicepción (Mollay, C. *et al.*, mencionado anteriormente), motilidad del tracto gastrointestinal (Li, M. *et al.*, mencionado anteriormente), regulación del ritmo circadiano locomotor (Cheng, M. Y., *et al.*, Nature 417, 405-410 (2002)) y neurogénesis del bulbo olfatorio (Matsumoto, S., *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 103, 4140-4145 (2006)). Además, Bv8 estimuló la

producción de colonias granulocíticas y monocíticas *in vitro* (LeCouter, J. *et al.*, (2003), mencionado anteriormente; Dorsch, M. *et al.*, J. Leukoc Biol 78(2), 426-34 (2005)). Bv8 se ha caracterizado como un quimioatrayente para macrófagos (LeCouter *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 101, 16813-16919 (2004)).

- 5 Shojaei, F. *et al.*, Nature, Nature Publishing Group Vol. 450, No. 7171, 825-831 (2007) analizan el papel de Bv8 en la angiogénesis tumoral y muestran que anticuerpos anti Bv8 monoclonales murinos inhiben el crecimiento de tumores y suprimen la angiogénesis *in vivo*. Dichos efectos son aditivos a anticuerpos anti VEGF y anticuerpos anti VEGF en combinación con cisplatino.
- 10 El documento WO2009/039337 desvela la prevención/tratamiento de angiogénesis tumoral, inhibición del desarrollo tumoral e inhibición de la angiogénesis mediada por células inflamatorias usando anticuerpos de Bv8 (especialmente tumores resistentes a tratamiento con antagonistas de VEGF) incluyendo la combinación con anticuerpo anti-VEGF y cisplatino. Desvela además la generación de anticuerpos anti-Bv8 neutralizantes.
- 15 A la vista del papel de la angiogénesis en muchas enfermedades y trastornos, es deseable tener un medio para reducir o inhibir uno o más de los efectos biológicos que provocan estos procesos.

Sumario de la invención

20 La invención se basa en parte en una diversidad de anticuerpos para Bv8. Bv8 se presenta como una diana terapéutica importante y ventajosa, y la invención proporciona anticuerpos como agentes terapéuticos y de diagnóstico para uso en la dirección a afecciones patológicas asociadas con expresión y/o actividad de Bv8. En consecuencia, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con Bv8.

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 comprende además secuencia marco conservada consenso de subgrupo IV VL kappa humana. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 comprende además la secuencia marco conservada consenso de subgrupo I de VH humana. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 comprende además la secuencia de marco conservada consenso de subgrupo IV de VL kappa humana y secuencia marco conservada consenso de subgrupo I de VH humana. En ciertas realizaciones, la secuencia de marco conservada consenso de subgrupo IV de VL kappa humana sin tres secuencias de HVR de cadena ligera es SEQ ID NO: 240. En ciertas realizaciones, la secuencia marco conservada consenso de subgrupo I de VH sin las tres secuencias de HVR de cadena pesada es SEQ ID NO: 241.

35 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende:

- 40 (1) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;  
 (2) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;  
 (3) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63;  
 (4) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;  
 (5) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y  
 (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

45 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende:

- 50 (1) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91;  
 (2) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92;  
 (3) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93;  
 (4) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94;  
 (5) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95; y  
 (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

55 En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8.

60 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 12.

65 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15.

## ES 2 585 350 T3

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15.

5 En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

10 En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

15 En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

20 En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16.

25 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16.

30 En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

35 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

40 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

45 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16.

50 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti Bv8 se une con Bv8 humano con un valor de Kd menor de aproximadamente 0,02 nM.

55 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti Bv8 se une con Bv8 humano con un valor de Kd de aproximadamente 0,01 nM o menor.

60 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti Bv8 se une con Bv8 humano de una manera al menos dos veces más estrecha que el anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti Bv8 se une con Bv8 humano de una manera al menos cinco veces más estrecha que el anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico.

65

En ciertas realizaciones, el valor de Kd se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, el valor de Kd se mide usando un anticuerpo anti Bv8 de longitud completa. En ciertas realizaciones, el valor de Kd se mide usando la versión Fab del anticuerpo anti Bv8.

5 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une con Bv8 o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 23 y el dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 24.

10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 está humanizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 es humano. En ciertas realizaciones, al menos una parte de la secuencia de marco conservado del anticuerpo anti Bv8 es una secuencia de marco conservado consenso humana. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')<sub>2</sub>.

15 En ciertas realizaciones, se proporciona un polinucleótido o ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En una realización, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido o el ácido nucleico. En una realización, el vector es un vector de expresión. En una realización, se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector. En una realización, la célula hospedadora es eucariota. En una realización, la célula hospedadora es procariota. En una realización, la célula hospedadora es una célula CHO. En una realización, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti Bv8, en el que el método comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aislar el anticuerpo.

20 En ciertas realizaciones, la invención se refiere además a una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 anteriores. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 anteriores en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de metástasis tumoral que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar la presencia de Bv8 en una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti Bv8 de la invención en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo con Bv8, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y Bv8.

35 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, glioblastoma, cáncer esofágico, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer pancreático y carcinoma hepatocelular. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer ovárico o glioblastoma. Se proporciona en el presente documento una lista ejemplar y no limitante de cánceres contemplados bajo "Definiciones".

40 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir o inhibir la angiogénesis en un sujeto que tiene una afección patológica asociada con angiogénesis, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la afección patológica es una afección neoplásica. En ciertas realizaciones, la afección patológica es una afección no neoplásica. Se proporciona en el presente documento una lista ejemplar y no limitante de afecciones no neoplásicas contempladas bajo "Definiciones". En ciertas realizaciones, la afección no neoplásica se selecciona del grupo que consiste en retinopatías diabéticas y otras proliferativas, retinopatía del prematuro, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización comeana, neovascularización de injerto comeano, neovascularización retiniana/coroidal y artritis reumatoide.

45 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, las células endoteliales son células endoteliales corticales adrenales.

50 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la migración de neutrófilos, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento.

55 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la metástasis tumoral que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8. En ciertas realizaciones, la metástasis está en el sistema linfático. En ciertas realizaciones, la metástasis está en un órgano distante.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar, prevenir o reducir el dolor que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el dolor es dolor agudo o crónico. En ciertas realizaciones, el dolor es dolor inflamatorio agudo o crónico. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar artritis reumatoide que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos anteriormente y anteriores comprenden además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo medicamento, en el que el anticuerpo anti Bv8 es el primer medicamento. En ciertas realizaciones, el segundo medicamento es otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citocina, un antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, una vacuna de cáncer, un analgésico o un agente inhibidor del crecimiento. En ciertas realizaciones, el segundo medicamento es un agente antiangiogénico. En ciertas realizaciones, el segundo medicamento o el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti VEGF. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab. En ciertas realizaciones, el segundo medicamento se administra antes o después de la administración del anticuerpo anti Bv8. En ciertas realizaciones, el segundo medicamento se administra simultáneamente con el anticuerpo anti Bv8. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un tercer medicamento, en el que el tercer medicamento es un agente quimioterapéutico.

Se proporciona una lista ejemplar y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados en el presente documento bajo "definiciones". En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, cisplatino, gemcitabina y pemetrexed.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para potenciar la eficacia de un agente antiangiogénico en un sujeto que tenga una afección patológica asociada con angiogénesis, comprendiendo los métodos administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento en combinación con el agente antiangiogénico, potenciando de este modo la actividad inhibidora de dicho agente antiangiogénico. En ciertas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular. En ciertas realizaciones, la afección patológica asociada con angiogénesis es una afección no neoplásica. En ciertas realizaciones, la afección no neoplásica se selecciona del grupo que consiste en retinopatías diabéticas y otras proliferativas, retinopatía del prematuro, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneana, neovascularización de injerto corneano, neovascularización retiniana/coroidal y artritis reumatoide. En ciertas realizaciones, la afección no neoplásica es artritis reumatoide.

En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente con cáncer humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente con cáncer humano al que puede haberse diagnosticado o que puede estar en riesgo de desarrollar metástasis. En ciertas realizaciones, el sujeto recae de o es refractario a un antagonista de VEGF. En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab.

En ciertas realizaciones, el agente antiangiogénico se administra antes o después de la administración de anticuerpo anti Bv8. En ciertas realizaciones, el agente antiangiogénico se administra simultáneamente con el anticuerpo anti Bv8. En ciertas realizaciones, el agente antiangiogénico es un agente anti VEGF. En ciertas realizaciones, el agente anti VEGF es un anticuerpo anti VEGF. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab.

Cualquier realización descrita en el presente documento o cualquier combinación de las mismas se aplica a todos y cada uno de los anticuerpos anti Bv8 y métodos de la invención descritos en el presente documento.

#### Breve descripción de las figuras

FIGURA 1A-F: secuencias de bucle de HVR de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos anti Bv8. Las Figuras muestran las secuencias de HVR de cadena ligera, L1, L2 y L3, y secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. La numeración de secuencia para cada anticuerpo es la siguiente: 2G9 Quimérica (HVR-H1 es SEQ ID NO: 49; HVR-H2 es SEQ ID NO: 50; HVR-H3 es SEQ ID NO: 51; HVR-L1 es SEQ ID NO: 52; HVR-L2 es SEQ ID NO: 53; HVR-L3 es SEQ ID NO: 54); h2G9.K4G1.Polish (HVR-L1 es SEQ ID NO: 55; HVR-L2 es SEQ ID NO: 56; HVR-L3 es SEQ ID NO: 57; HVR-H1 es SEQ ID NO: 58; HVR-H2 es SEQ ID NO: 59; HVR-H3 es SEQ ID NO: 60); h2G9.K4G1.v19 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 61; HVR-L2 es SEQ ID NO: 62; HVR-L3 es SEQ ID NO: 63; HVR-H1 es SEQ ID NO: 64; HVR-H2 es SEQ ID NO: 65; HVR-H3 es SEQ ID NO: 66); h2G9.K4G1.v25 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 67; HVR-L2 es SEQ ID NO: 68; HVR-L3 es SEQ ID NO: 69; HVR-H1 es SEQ ID NO: 70; HVR-H2 es SEQ ID NO: 71; HVR-H3 es SEQ ID NO: 72); h2G9.K4G1.v27 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 73; HVR-L2 es SEQ ID NO: 74; HVR-L3 es SEQ ID NO: 75; HVR-H1 es SEQ ID NO: 76; HVR-H2 es SEQ ID NO: 77; HVR-H3 es SEQ ID NO: 78); h2G9.K4G1.v37 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 79; HVR-L2 es SEQ ID NO: 80; HVR-L3 es SEQ ID NO: 81; HVR-H1 es SEQ ID NO: 82; HVR-H2 es SEQ ID NO: 83; HVR-H3 es SEQ ID NO: 84); h2G9.K4G1.v52 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 85; HVR-L2 es SEQ ID NO: 86; HVR-L3 es SEQ ID NO: 87);

HVR-H1 es SEQ ID NO: 88; HVR-H2 es SEQ ID NO: 89; HVR-H3 es SEQ ID NO: 90); h2G9.K4G1.v55 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 91; HVR-L2 es SEQ ID NO: 92; HVR-L3 es SEQ ID NO: 93; HVR-H1 es SEQ ID NO: 94; HVR-H2 es SEQ ID NO: 95; HVR-H3 es SEQ ID NO: 96); h2G9.K4G1.v63 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 97; HVR-L2 es SEQ ID NO: 98; HVR-L3 es SEQ ID NO: 99; HVR-H1 es SEQ ID NO: 100; HVR-H2 es SEQ ID NO: 101; HVR-H3 es SEQ ID NO: 102); h2G9.K4G1.v64 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 103; HVR-L2 es SEQ ID NO: 104; HVR-L3 es SEQ ID NO: 105; HVR-H1 es SEQ ID NO: 106; HVR-H2 es SEQ ID NO: 107; HVR-H3 es SEQ ID NO: 108); h2G9.K4G1.v65 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 109; HVR-L2 es SEQ ID NO: 110; HVR-L3 es SEQ ID NO: 111; HVR-H1 es SEQ ID NO: 112; HVR-H2 es SEQ ID NO: 113; HVR-H3 es SEQ ID NO: 114); h2G9.K4G1.v67 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 115; HVR-L2 es SEQ ID NO: 116; HVR-L3 es SEQ ID NO: 117; HVR-H1 es SEQ ID NO: 118; HVR-H2 es SEQ ID NO: 119; HVR-H3 es SEQ ID NO: 120); h2G9.K4G1.v73 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 121; HVR-L2 es SEQ ID NO: 122; HVR-L3 es SEQ ID NO: 123; HVR-H1 es SEQ ID NO: 124; HVR-H2 es SEQ ID NO: 125; HVR-H3 es SEQ ID NO: 126); h2G9.K4G1.v75 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 127; HVR-L2 es SEQ ID NO: 128; HVR-L3 es SEQ ID NO: 129; HVR-H1 es SEQ ID NO: 130; HVR-H2 es SEQ ID NO: 131; HVR-H3 es SEQ ID NO: 132); h2G9.K4G1.v77 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 133; HVR-L2 es SEQ ID NO: 134; HVR-L3 es SEQ ID NO: 135; HVR-H1 es SEQ ID NO: 136; HVR-H2 es SEQ ID NO: 137; HVR-H3 es SEQ ID NO: 138); h2G9.K4G1.v80 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 139; HVR-L2 es SEQ ID NO: 140; HVR-L3 es SEQ ID NO: 141; HVR-H1 es SEQ ID NO: 142; HVR-H2 es SEQ ID NO: 143; HVR-H3 es SEQ ID NO: 144); h2G9.K4G1.v92 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 145; HVR-L2 es SEQ ID NO: 146; HVR-L3 es SEQ ID NO: 147; HVR-H1 es SEQ ID NO: 148; HVR-H2 es SEQ ID NO: 149; HVR-H3 es SEQ ID NO: 150); h2G9.K4G1.v19H/v55L (HVR-L1 es SEQ ID NO: 151; HVR-L2 es SEQ ID NO: 152; HVR-L3 es SEQ ID NO: 153; HVR-H1 es SEQ ID NO: 154; HVR-H2 es SEQ ID NO: 155; HVR-H3 es SEQ ID NO: 156); 2B9 quimérico (HVR-L1 es SEQ ID NO: 157; HVR-L2 es SEQ ID NO: 158; HVR-L3 es SEQ ID NO: 159; HVR-H1 es SEQ ID NO: 160; HVR-H2 es SEQ ID NO: 161; HVR-H3 es SEQ ID NO: 162); h2B9.v1 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 163; HVR-L2 es SEQ ID NO: 164; HVR-L3 es SEQ ID NO: 165; HVR-H1 es SEQ ID NO: 166; HVR-H2 es SEQ ID NO: 167; HVR-H3 es SEQ ID NO: 168); h2B9.v10 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 169; HVR-L2 es SEQ ID NO: 170; HVR-L3 es SEQ ID NO: 171; HVR-H1 es SEQ ID NO: 172; HVR-H2 es SEQ ID NO: 173; HVR-H3 es SEQ ID NO: 174); h2B9.v23 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 175; HVR-L2 es SEQ ID NO: 176; HVR-L3 es SEQ ID NO: 177; HVR-H1 es SEQ ID NO: 178; HVR-H2 es SEQ ID NO: 179; HVR-H3 es SEQ ID NO: 180); h2B9.v37 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 181; HVR-L2 es SEQ ID NO: 182; HVR-L3 es SEQ ID NO: 183; HVR-H1 es SEQ ID NO: 184; HVR-H2 es SEQ ID NO: 185; HVR-H3 es SEQ ID NO: 186); h2B9.v56 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 187; HVR-L2 es SEQ ID NO: 188; HVR-L3 es SEQ ID NO: 189; HVR-H1 es SEQ ID NO: 190; HVR-H2 es SEQ ID NO: 191; HVR-H3 es SEQ ID NO: 192); h2B9.v76 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 193; HVR-L2 es SEQ ID NO: 194; HVR-L3 es SEQ ID NO: 195; HVR-H1 es SEQ ID NO: 196; HVR-H2 es SEQ ID NO: 197; HVR-H3 es SEQ ID NO: 198); 3F1 quimérico (HVR-L1 es SEQ ID NO: 199; HVR-L2 es SEQ ID NO: 200; HVR-L3 es SEQ ID NO: 201; HVR-H1 es SEQ ID NO: 202; HVR-H2 es SEQ ID NO: 203; HVR-H3 es SEQ ID NO: 204); h3F1.v1 (HVR-L1 es SEQ ID NO: 205; HVR-L2 es SEQ ID NO: 206; HVR-L3 es SEQ ID NO: 207; HVR-H1 es SEQ ID NO: 208; HVR-H2 es SEQ ID NO: 209; HVR-H3 es SEQ ID NO: 210); y 2D3 quimérico (HVR-L1 es SEQ ID NO: 211; HVR-L2 es SEQ ID NO: 212; HVR-L3 es SEQ ID NO: 213; HVR-H1 es SEQ ID NO: 214; HVR-H2 es SEQ ID NO: 215; HVR-H3 es SEQ ID NO: 216). Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

FIGURA 1G. Secuencia de marco conservado consenso de subgrupo IV de VL kappa humano sin secuencias de HVR de cadena ligera de Kabat se muestra en SEQ ID NO: 240. La secuencia de marco conservado consenso del subgrupo I de VH humano sin secuencias de HVR de cadena pesada de Kabat se muestra en SEQ ID NO: 241.

FIGURA 2A-B. Las secuencias de aminoácidos de (A) el dominio variable de cadena ligera y (B) dominio variable de cadena pesada de variantes 2G9 de anticuerpo anti Bv8. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 3A-B. Las secuencias de aminoácidos de (A) el dominio variable de cadena ligera y (B) dominio variable de cadena pesada de variantes 2B9 de anticuerpo anti Bv8. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 4A-B. Las secuencias de aminoácidos de (A) el dominio variable de cadena ligera y (B) dominio variable de cadena pesada de variantes 3F1 de anticuerpo anti Bv8. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 5A-B. Las secuencias de aminoácidos de (A) el dominio variable de cadena ligera y (B) dominio variable de cadena pesada de variantes 2D3 de anticuerpo anti Bv8. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 6A-B. Las secuencias de aminoácidos de (A) el dominio variable de cadena ligera y (B) dominio variable de cadena pesada de variantes 2B9 de anticuerpo anti Bv8 humanizado. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 7. Las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que muestran la diferencia entre (1) la secuencia de marco conservado de 2G9 (m2G9) de ratón y secuencia de marco conservado Kappa I consenso humano y (2) la secuencia de marco conservado de m2G9 y secuencia de marco conservado Kappa IV consenso humano. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 8. Las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que muestran la diferencia entre (1) la secuencia de marco conservado de 2G9 de ratón (m2G9) y secuencia de marco conservado de subgrupo I (G1) consenso humano y (2) la secuencia de marco conservado de m2G9 y secuencia de marco

conservado de subgrupo III consenso humano (G3). Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables están encuadradas.

FIGURA 9. Las secuencias de aminoácidos de L1, L2 y L3 para anticuerpos anti Bv8 h2G9.K4G1.Polish, h2G9.K4G1.v27, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v63, h2G9.K4G1.v64, h2G9.K4G1.v67, h2G9.K4G1.v77 y h2G9.K4G1.v80.

FIGURA 10. Las secuencias de aminoácidos de H1, H2 y H3 para anticuerpos anti Bv8 h2G9.K4G1.Polish, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v25, h2G9.K4G1.v37, h2G9.K4G1.v65, h2G9.K4G1.v73, h2G9.K4G1.v75, h2G9.K4G1.v77, h2G9.K4G1.v92.

La FIGURA 11 muestra que el anticuerpo 2D3 quimérico puede tener distinto epítipo o distintos epítipos de los anticuerpos 2B9 quimérico así como 3F1 quimérico y 2G9 quimérico. El ensayo de ELISA de competición muestra que los anticuerpos 3F1 quimérico y 2G9 quimérico compitieron con la unión de 2B9 quimérico a Bv8 humano. 2D3 quimérico compitió solo parcialmente con la unión del anticuerpo 2B9 quimérico con Bv8 humano.

La FIGURA 12 muestra el bloqueo de la proliferación de células ACE inducidas por Bv8 humano por 2G9 de ratón, 2G9 quimérico, 2B9 de ratón, 2B9 quimérico y 3F1 quimérico. Los resultados del ensayo muestran que 2G9 quimérico es capaz de inhibir completamente la proliferación de células ACE inducida por Bv8 humano.

La FIGURA 13 muestra el bloqueo de la proliferación de células ACE inducida por Bv8 por los anticuerpos anti Bv8 2G9, h2G9.K4G1, h2G9.K4G3, h2G9.K1G1 y h2G9.K1G3 quiméricos. Los resultados del ensayo muestran que el anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico tiene la mayor actividad de bloqueo a una concentración de anticuerpos de 20 µg/ml.

La FIGURA 14A-B representan resultados de un ensayo de competición de fagos que demuestran la unión de variantes de h2G9.K4G1 (L1: D28E, D28S, G29A, G29S, H2: C52aA, C52aS, N54A, N54S, H3: D95E, D95S, G96A y G96S) frente a Bv8 humano.

La FIGURA 15 muestra el bloqueo de la proliferación de células ACE inducida por Bv8 humano mediante anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico y h2G9.K4G1.Polish.

La FIGURA 16 representa los resultados de un ensayo de competición de fagos que demuestran la unión de las variantes h2G9.K4G1.Polish con afinidad mejorada (h2G9.K4G1.v27, v52, v55, v63, v64, v67, v77, v80 de biblioteca con selección aleatoria suave L1/L2) frente a Bv8 humano.

La FIGURA 17 representa los resultados de un ensayo de competición de fagos que demuestran la unión de las variantes h2G9.K4G1.Polish con afinidad mejorada (h2G9.K4G1.v19, v25, v37, v65, v73, v75, v77, v92 de biblioteca con selección aleatoria suave H1/H2) frente a Bv8 humano.

La FIGURA 18 muestra constantes de disociación de los siguientes anticuerpos anti Bv8 (FAB) contra Bv8 humano: h2G9.K4G1.Polish, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55 y h2G9.K4G1.v73.

La FIGURA 19 muestra constantes de disociación de anticuerpos anti Bv8 humanizados (Fab e IgG) h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 frente a Bv8 humano y Bv8 de mono cinomolgus.

La FIGURA 20 muestra los sensogramas para inyección de anticuerpos Fab anti Bv8 50 nM a 25 °C sobre microplaca de BIAcore con Bv8 humano inmovilizado que demuestran las mejoras de la velocidad de disociación.

La FIGURA 21 muestra constantes de disociación de los siguientes anticuerpos anti Bv8 (IgG) contra Bv8 humano y Bv8 de mono cinomolgus: 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55. Los resultados muestran que las afinidades de anticuerpos anti Bv8 humanizados, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55, parecen ser al menos dos veces más estrechos que el anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico.

La FIGURA 22 muestra que los anticuerpos anti Bv8 humanizados bloquean la unión de Bv8 humano con anticuerpo 2G9 de ratón. Los cinco anticuerpos anti Bv8 humanizados con afinidad madurada (h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 y h2G9.K4G1.v19H/v55L) tienen capacidades de bloqueo aproximadamente 5-8 veces más fuertes en comparación con la molécula K4G1 pulida parental.

La FIGURA 23 muestra el bloqueo de la proliferación de células ACE inducida por Bv8 humano mediante anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico, h2G9K4G1.Polish, h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v52, h2G9K4G1.v55 y h2G9K4G1.v73 a concentraciones indicadas (µg/ml). Los anticuerpos anti-Bv8 humanizados h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v52, h2G9K4G1.v55 y h2G9K4G1.v73 mostraron mejoras significativas en el bloqueo de proliferación de ACE inducida por Bv8 humano.

La FIGURA 24 muestra el bloqueo de la proliferación de células ACE inducida por Bv8 de ratón mediante anticuerpos anti Bv8 h2G9K4G1.Polished, h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v55 y 2D3 quimérico a concentraciones indicadas (µg/ml).

FIGURA 25. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 3F1 quimérico, 2B9 quimérico, 2D3 quimérico y 2G9 quimérico en el tratamiento de cáncer de colon humano HM7.

FIGURA 26. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 3F1 quimérico, 2B9 quimérico, 2D3 quimérico y 2G9 quimérico en el tratamiento de cáncer de rdbdomiosarcoma humano A673.

FIGURA 27. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 3F1 quimérico, 2B9 quimérico, 2D3 quimérico y 2G9 quimérico en el tratamiento de cáncer de colon humano HT55.

FIGURA 28. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 3F1 quimérico, 2B9 quimérico, 2D3 quimérico y 2G9 quimérico en el tratamiento de cáncer de pulmón humano Calu-6.

FIGURA 29. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 3F1 quimérico, 2B9 quimérico, 2D3 quimérico y 2G9 quimérico en el tratamiento de cáncer de colon humano Colo-205.

FIGURA 30. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 3F1 quimérico, 2B9 quimérico, 2D3 quimérico y 2G9 quimérico en el tratamiento de cáncer pancreático humano HPAC.

FIGURA 31. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 en el tratamiento de cáncer de pulmón humano Calu-6.

FIGURA 32. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 2D3 quimérico, h2G9.K4G1.Polish, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 en el tratamiento de cáncer de colon humano HM7.

FIGURA 33. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 en el tratamiento de cáncer de rhabdomyosarcoma humano A673.

5 FIGURA 34. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 en el tratamiento de cáncer de colon humano HT55.

FIGURA 35. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 en el tratamiento de cáncer de colon humano Colo-205.

10 FIGURA 36. Estudio de eficacia de anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55 en el tratamiento de cáncer pancreático humano HPAC.

FIGURA 37. Estudio de eficacia de anticuerpos de ratón anti Bv8 (3F1 y 2B9) en el tratamiento de células de carcinoma de pulmón no microcítico humano LXF529 con y sin anticuerpo anti VEGF.

La FIGURA 38 muestra inhibición del crecimiento de aloinjertos de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) en respuesta al anticuerpo anti Bv8 como un único agente o en combinación con anticuerpo anti VEGF.

15 La FIGURA 39 muestra inhibición del crecimiento de xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano HM7 en respuesta a un anticuerpo anti Bv8 como un único agente o en combinación con anticuerpo anti VEGF.

La FIGURA 40 muestra la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de carcinoma de pulmón no microcítico humano H460 en respuesta a anticuerpo anti Bv8 en combinación con anticuerpo anti VEGF.

20 La FIGURA 41 muestra supervivencia prolongada de ratones que portan xenoinjertos de carcinoma de pulmón no microcítico humano H460 en respuesta a anticuerpo anti Bv8 en combinación con anticuerpo anti VEGF.

La FIGURA 42 muestra inhibición del crecimiento de xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano HT29 en respuesta a anticuerpos anti Bv8 solos o en combinación con anticuerpo anti VEGF.

La FIGURA 43 muestra supervivencia prolongada de ratones que portan xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano HT29 en respuesta a anticuerpo anti Bv8 solo o en combinación con anticuerpo anti VEGF.

25 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para anticuerpos anti Bv8. Se proporcionan en el presente documento detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación.

30 *Técnicas generales*

Las técnicas y los procedimientos descritos o referidos en el presente documento se entienden en general bien y se emplean habitualmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3<sup>a</sup> edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

40 *Definiciones*

Los términos "Bv8", "homólogo de Bv8", "prokineticina-2" (también conocidos como "PK2", "KAL4" y "MIT1") se usan en el presente documento indistintamente y se refieren al polipéptido de longitud completa y/o los fragmentos activos del polipéptido de longitud completa. La secuencia nativa de Bv8 abarca formas prepro, pro y maduras de origen natural y formas truncadas de Bv8, formas variantes de origen natural (por ejemplo formas de corte y empalme alternativo y variantes alélicas de origen natural). En ciertas realizaciones, se muestran secuencias de aminoácidos de Bv8 nativas en SEQ ID NO: 235 a 239. También se desvelan secuencias de Bv8 humanas y murinas, por ejemplo, en Wechselberger *et al.* (FEBS Lett. 462: 177-181 (1999)) y Li *et al.* (Mol. Pharm. 59: 692-698 (2001)).

"Receptor de Bv8" es una molécula con la que se une Bv8 y que media en las propiedades biológicas de Bv8. Por lo tanto, la expresión "receptor de Bv8" incluye dentro de su significado PKR1/GPR73/receptor de EG-VEGF 1/PROKR1 y PKR2/GPR73L1/receptor de EG-VEGF 2/PROKR2 (LeCouter *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 2685-2690; Lin *et al.*, 2002, J. Biol. Chem., 277: 19276-19280; Masuda *et al.*, 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 293: 396-402).

La expresión "actividad biológica" y "biológicamente activo" con respecto a un polipéptido se refiere a la capacidad de una molécula para unirse específicamente con y regular las respuestas celulares, por ejemplo, proliferación, migración, etc. Las respuestas celulares también incluyen las mediadas por un receptor, incluyendo, pero sin limitación, migración y/o proliferación.

"Activo" o "actividad", en relación con Bv8, para los fines del presente documento se refieren a una forma o formas de Bv8 que conservan una actividad biológica y/o inmunológica de Bv8 de origen natural o nativo, en el que la actividad "biológica" se refiere a una función biológica (bien inhibidora o bien estimulante) provocada por un Bv8

nativo o de origen natural, distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico, poseído por un Bv8 nativo de origen natural, y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un Bv8 nativo o de origen natural. En ciertas realizaciones, la actividad biológica de Bv8 es la capacidad para modular la movilización de células mieloides, promover la angiogénesis tumoral y/o promover la metástasis tumoral.

La expresión “anticuerpo anti-Bv8” o “un anticuerpo que se une con Bv8” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con Bv8 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a Bv8. En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une con Bv8 tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$  o  $\leq 0,01 \text{ nM}$ . En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti Bv8 se une con un epítipo de Bv8 que está conservado entre Bv8 de diferentes especies. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 se une con un mismo epítipo en Bv8 humano que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 y 2D3 quimérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 compite por la unión con Bv8 humano con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 2G9 quimérico, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 y 2D3 quimérico.

La “afinidad de unión” se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general con el antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad en general se unen con el antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para fines de la presente invención. Se describen a continuación realizaciones ilustrativas específicas.

En ciertas realizaciones, el “Kd” o “valor Kd” acorde se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo anti Bv8 y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881). Para establecer condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante una noche con 5  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y se bloquean posteriormente con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [ $^{125}\text{I}$ ]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación de un anticuerpo anti VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599). El Fab de interés se incuba después durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución se retira después y la placa se lava ocho veces con Tween<sup>TM</sup>-20 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150  $\mu\text{l}$ / pocillo de agente de centelleo (Microscint<sup>TM</sup>-20; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TopCount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab, que proporcionan menos de o igual al 20 % de la unión máxima, se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización, la Kd o el valor de Kd, se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore<sup>TM</sup>-2000 o un BIAcore<sup>TM</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas de CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5  $\mu\text{g/ml}$  (~0,2  $\mu\text{M}$ ) antes de inyección a un caudal de 5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween<sup>TM</sup> 20 (PBST) 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las velocidades de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (BIAcore Evaluation Software<sup>TM</sup> versión 3.2) mediante ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la relación  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Si la velocidad de disociación supera  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como una espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o situación distinta de en la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por tanto de la molécula de ácido nucleico como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

Se entiende que el término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores recombinantes" o "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, puede transmitirse modificación de la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como por conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "recubrimientos terminales", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, los que tienen enlaces sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y los que tienen enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), los que tienen intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales para nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos terminales orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-ailil-, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y un análogo nucleosídico básico tal como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR<sub>2</sub>" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en los que cada R o R' es de forma independiente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere en general a polinucleótidos cortos, en general monocatenarios, en general sintéticos, que son en general, pero no necesariamente, de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

Los términos "anticuerpo" y "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describen en más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que no estará presente al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo. Habitualmente, sin embargo, se preparará anticuerpo aislado por al menos una etapa de purificación.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentran en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad o regiones hipervariables (CDR o HVR, usadas indistintamente en el presente documento), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan el marco conservado (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina  $\beta$ , conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en proximidad estrecha por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único 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  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de combinación con antígeno y aún tiene capacidad de entrecruzamiento con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión a antígeno. En una especie de Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En una única especie Fv monocatenaria, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con un antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

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 fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación del presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, en la que la parte preferentemente conserva al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$  y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos

monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y por lo tanto conserva la capacidad para unirse con antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de semivida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender una rama de unión a antígeno unida a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

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

Están en uso y abarcadas en el presente documento varias delineaciones de HVR. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR “de contacto” se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H-102	H96-H101	H93-H101

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

Los restos de “marco conservado” o “FR” son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en el presente documento.

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

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

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une con una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debería entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multispecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque están típicamente no contaminadas por otras inmunoglobulinas.

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

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

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

La “especificidad poliepitópica” se refiere a la capacidad para unirse específicamente con dos o más epítopos diferentes en antígeno o antígenos iguales o diferentes. Por ejemplo, “biespecífico” como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad para unirse con dos epítopos diferentes. “Monospecífico” se refiere a la capacidad de unirse solamente con un epítipo.

La expresión “anticuerpos de un único dominio” (sdAb) o “anticuerpos de un único dominio variable (SVD)” se refieren en general a anticuerpos en los que un único dominio variable ( $V_H$  o  $V_L$ ) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, no es necesario que el dominio variable individual interaccione con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Los ejemplos de anticuerpos de un único dominio incluyen los derivados de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilagosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los derivados de métodos recombinantes de seres humanos y anticuerpos de ratón (Nature (1989) 341: 544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30: 43-56; Tendencia Biochem Sci (2001) 26: 230-235; Trends Biotechnol (2003): 21: 484-490; documentos WO 2005/035572; WO 03/035694; FEBS Lett (1994) 339: 285 -290; WO 00/29004, WO 02/051870).

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Un “antígeno” es un antígeno predeterminado al que puede unirse de forma selectiva un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado con un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_HV_L$ ). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetrauerpos en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

La expresión “numeración de restos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de posición de aminoácido como en Kabat” y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. Usado este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto de FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de restos puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”.

El sistema de numeración de Kabat se usa en general cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente restos 1-107 de la cadena ligera y restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración de EU” o “índice EU” se usa en general cuando se hace referencia a un resto en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU presentado en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente). El “índice EU como en Kabat” se refiere a la numeración de restos del anticuerpo IgG1 humano EU. A no ser que se indique de otro modo en el presente documento, las referencias a números de restos en el dominio variable de anticuerpos significan numeración de restos por el sistema de numeración de Kabat. A no ser que se indique de otro modo en el presente documento, las referencias a números de restos en el dominio constante de anticuerpos significan numeración de restos por el sistema de numeración de EU (por ejemplo, véase Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/640.323, Figuras para numeración de EU).

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

5 La expresión “sustancialmente similar” o “sustancialmente igual”, como se usa en el presente documento, indica un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre  
10 dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente 50 %, menor de aproximadamente 40 %, menor de aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 20 % y/o menor de aproximadamente 10 % en función del valor de referencia/comparador.

15 La expresión “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10 %, mayor de aproximadamente 20 %, mayor de aproximadamente 30 %, mayor de aproximadamente 40 % y/o mayor que aproximadamente 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

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

30 La expresión “región Fc” en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones de Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, se define habitualmente que la región Fc de cadena pesada de IgG humana abarca desde un resto de aminoácido en la posición Cys226 o de Pro230 al extremo carboxilo terminal de la misma. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o modificando  
35 técnicamente de forma recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

40 Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ejemplares incluyen unión de C1q; CDC; unión del receptor de Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de linfocitos B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos como se desvela, por ejemplo, en definiciones del presente documento.

50 Una “región de Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como variantes de origen natural de las mismas.

55 Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa  
60 o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante del presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de homología con la misma.

65 “Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une con un

anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con corte y empalme alternativo de esos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase, por ejemplo, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Se revisan FcR, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento.

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

La unión con FcRn humano *in vivo* y semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humanos puede ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. La Publicación de PCT WO 2000/42072 (Presta) y Solicitud de Estados Unidos n.º 12/577.967 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida con FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función o funciones efectoras ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citotóxicos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

La “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo linfocitos NK, neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígenos y posteriormente destruya la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337 o la Patente de Estados Unidos n.º 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen PBMC y linfocitos NK. Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

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

La expresión “anticuerpo que comprende región Fc” se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En consecuencia, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo el K447 retirado, o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Un “marco conservado humano aceptor” para los fines del presente documento es un marco conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco conservado VL o VH derivado de un marco conservado de inmunoglobulina humana, o de un marco conservado consenso humano. Un marco conservado humano aceptor “derivado de” un marco conservado de inmunoglobulina humana o marco conservado consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos preexistentes. Cuando estén presentes cambios de aminoácidos preexistentes, están presentes

preferentemente no más de 5 y preferentemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexistentes. Cuando estén presentes cambios de aminoácidos preexistentes en un VH, preferentemente esos cambios son solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el marco conservado humano aceptor VL es idéntico en secuencia a la secuencia de marco conservado de inmunoglobulina humana VL o secuencia de marco conservado consenso humano.

Un “marco conservado consenso humano” es un marco conservado que representa el resto de aminoácido que aparece más habitualmente en una selección de secuencias de marco conservado VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En una realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa IV como en Kabat *et al.* En una realización, para el VH, el subgrupo es subgrupo I como en Kabat *et al.* Un “marco conservado consenso de subgrupo I de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I pesado variable de Kabat *et al.*

Un “marco conservado consenso de subgrupo I de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I pesado variable de Kabat *et al.*

Un “marco conservado consenso de subgrupo III de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat *et al.*

Un “marco conservado consenso de subgrupo IV de VL” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo IV kappa ligero variable de Kabat *et al.*

Un “marco conservado consenso de subgrupo I de VL” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat *et al.*

Un “medicamento” es un fármaco activo para tratar el trastorno en cuestión o sus síntomas, o efectos secundarios.

Un “trastorno” o una “enfermedad” es cualquier afección que se beneficie del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades, crónicos y agudos, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.

La “patología” de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Para el cáncer, esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anómalo o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células adyacentes, liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anómalos, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados con algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

“Tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, bien maligno o bien benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Las expresiones “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente excluyentes como se refieren en el presente documento.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento/proliferación celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la hipófisis, cáncer esofágico, astrocitoma, sarcoma de tejido blando, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer del hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, cáncer cerebral, cáncer endometrial, cáncer testicular, colangiocarcinoma, carcinoma de la vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratarse por composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen afecciones tanto neoplásicas como no neoplásicas. Las neoplásicas incluyen pero sin limitación las descritas anteriormente.

Las afecciones no neoplásicas que son susceptibles de tratamiento con anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, hipertrofia indeseada o aberrante, hipertrofia prostática benigna, dolor (agudo y crónico), incluyendo dolor inflamatorio, artritis, artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar), enfermedad autoinmunitaria, psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, tiroiditis de Hashimoto, trastornos angiogénicos, enfermedad ocular tal como síndrome de histoplasmosis ocular supuesto, vascularización retiniana, retinopatías diabéticas y otras proliferativas incluyendo retinopatía del prematuro, nefropatía diabética, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneana, neovascularización de injerto corneano, rechazo de injerto corneano, neovascularización retiniana/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, enfermedad vascular, afecciones que implican proliferación anómala de células epiteliales vasculares, reestenosis vascular, síndrome de Guillain-Barre, pólipos tales como pólipos de colon, poliposis adenomatosa familiar, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales, úlceras gastrointestinales, estenosis pilórica hipertrófica infantil, síndrome obstructivo urinario, enfermedad de Menetrier, adenomas secretorios o síndrome de pérdida de proteínas, fibroadenoma, enfermedad respiratoria, colecistitis, neurofibromatosis, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante corneano y de otros tejidos, enfermedades inflamatorias, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SDRA, septicemia, enfermedad pulmonar oclusiva crónica, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, ateroma, edema después de quemaduras, traumatismo, radiación, ictus, hipoxia o isquemia, edema de infarto de miocardio, lesión isquémica, daño después de un acontecimiento isquémico cerebral, edema cerebral (por ejemplo, asociado con ictus agudo/lesión cerrada de cabeza/traumatismo), trombo provocado por agregación plaquetaria, enfermedades fibróticas o de edema tales como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, tiroiditis, síndrome de hiperviscosidad, inflamación sinovial sistémica, formación de cataratas en AR, miositis osificante, formación de hueso hipertrófico, patologías asociadas con el hueso tales como osteoartritis, raquitismo y osteoporosis, ascitis refractaria, inflamación del hueso o las articulaciones, síndrome mielodisplásico, anemia aplásica, riñón o hígado; enfermedad de hipersensibilidad mediada por linfocitos T, enfermedad de Paget, enfermedad de riñón poliquístico, tercera clasificación de enfermedades fluidas (pancreatitis, síndrome de compartimento, quemaduras, enfermedad del intestino), inflamación crónica tal como EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), trastornos renales, rechazo de aloinjerto renal, enfermedad de injerto contra hospedador o rechazo de trasplante, enfermedad inflamatoria del intestino, nefropatías agudas y crónicas (incluyendo glomerulonefritis proliferativa y enfermedad renal inducida por diabetes), síndrome nefrótico, crecimiento de masa tisular indeseado o aberrante (distinto de cáncer), obesidad, crecimiento de masa de tejido adiposo, articulaciones hemófilas, cicatrices hipertróficas, inhibición de crecimiento del pelo, síndrome de Osler Weber-Rendu, fibroplasias retrolentales de granuloma piógeno, esclerodermia, tracomia, adhesiones vasculares, sinovitis, reacción de hipersensibilidad de la piel, trastornos cutáneos incluyendo psoriasis y dermatitis, eczema, fotoenvejecimiento (provocado por radiación UV de la piel humana), formación de cicatrices hipertróficas, afecciones reproductoras tales como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, enfermedad de ovario poliquístico, preeclampsia, hemorragia uterina disfuncional o menometrorragia, fibroides uterinos, parto prematuro, líquido ascítico, efusión pericárdica (tal como la asociada con pericarditis), efusión pleural, choque endotóxico e infección fúngica, ciertas infecciones microbianas incluyendo patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp., *Bordetella pertussis* y trastornos psiquiátricos (por ejemplo esquizofrenia, depresión bipolar, autismo y trastorno de déficit de atención).

El término "precanceroso" se refiere a una afección o un crecimiento que típicamente precede o se desarrolla en un cáncer. Un crecimiento "precanceroso" tendrá células que se caracterizan por regulación, proliferación o diferenciación del ciclo celular anómalas, que puede determinarse por marcadores de la regulación del ciclo celular, proliferación celular o diferenciación.

Por "displasia" se entiende cualquier crecimiento o desarrollo anómalo del tejido, órgano o células. En ciertas realizaciones, la displasia es de grado alto o precancerosa.

Por "metástasis" se entiende la propagación del cáncer desde su sitio primario a otros sitios en el cuerpo. Las células cancerosas pueden separarse de un tumor primario, penetrar en vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo, y crecer en un foco distante (metastatizar) en tejidos normales en otra parte del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, contingente en células tumorales que se separan del tumor primario, viajan a través del torrente sanguíneo o vasos linfáticos, y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un aporte sanguíneo y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal. En ciertas realizaciones, la expresión tumor metastásico se refiere a un tumor que es capaz de metastatizar, pero que aún no ha metastatizado a tejidos u órganos en otra parte del cuerpo. En ciertas realizaciones, la expresión tumor metastásico se refiere a un tumor que ha metastatizado a tejidos u órganos en otra parte del cuerpo.

Las rutas moleculares tanto estimulantes como inhibitorias dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento, y también son significativas las interacciones entre la célula tumoral y células hospedadoras en el sitio distante.

Por “no metastásico” se entiende un cáncer que es benigno o que permanece en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos sanguíneos o linfáticos o en tejidos distintos del sitio primario. En general, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que sea un cáncer de Estadio 0, I o II y ocasionalmente un cáncer en Estadio III.

5 El “órgano premetastásico” o “tejido premetastásico” como se usa en el presente documento, se refiere a un órgano o un tejido en el que no se han detectado células cancerosas de un tumor primario o de otra parte del cuerpo. En ciertas realizaciones, el órgano premetastásico o tejido premetastásico como se usa en el presente documento, se refiere a un órgano o tejido que está en la fase antes de haberse producido la propagación de células cancerosas de un tumor primario o de otra parte del cuerpo a este órgano o tejido. Los ejemplos de órgano premetastásico o tejido  
10 premetastásico incluyen, pero sin limitación, pulmón, hígado, cerebro, ovario, hueso y médula ósea.

Por “tumor primario” o “cáncer primario” se entiende el cáncer original y no una lesión metastásica localizada en otro tejido, órgano o localización en el cuerpo del sujeto.

15 El “órgano metastásico” o “tejido metastásico” se usa en el sentido más amplio, se refiere a un órgano o un tejido en el que las células cancerosas de un tumor primario o las células cancerosas de otra parte del cuerpo se han propagado. Los ejemplos de órgano metastásico y tejido metastásico incluyen, pero sin limitación, pulmón, hígado, cerebro, ovario, hueso y médula ósea.

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

25 Por “carga tumoral” se entiende el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor, o la cantidad de cáncer en el cuerpo.

Por “número tumoral” se entiende el número de tumores.

30 Como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo o célula que se trate, y puede realizarse bien para profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen evitar la aparición o reaparición de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o un  
35 trastorno.

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

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

Por “radioterapia” se entiende el uso de rayos gamma o rayos beta, dirigidos para inducir suficiente daño a una célula para limitar su capacidad para actuar normalmente o para destruir la célula por completo. Se apreciará que habrá muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Se proporcionan tratamientos típicos como una administración de una vez y las dosificaciones típicas varían de 10 a  
65 200 unidades (Grays) por día.

El término “VEGF” o “VEGF-A” como se usa en el presente documento se refiere al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos y factores de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 121, 189 y 206 aminoácidos relacionados, como se describe en Leung *et al.* (1989) Science 246: 1306, y Houck *et al.* (1991) Mol. Endocrin, 5: 1806, junto con las formas alélicas de origen natural y procesadas de los mismos. El término “VEGF” también se refiere a VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. En ocasiones el VEGF de una especie específica se indica por términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino y etc. El término “VEGF” también se usa para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos. Pueden identificarse en la presente solicitud referencias a cualquiera de dichas formas de VEGF, por ejemplo, por “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)”, “VEGF-A<sub>109</sub>” o “VEGF165”. Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo “truncado” se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en VEGF nativo truncado también es la posición 17 (metionina) en VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable a VEGF nativo.

Un “antagonista de VEGF” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo, pero sin limitación, su unión con uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente con VEGF secuestrando de este modo su unión con uno o más receptores, anticuerpos anti receptor de VEGF, antagonistas de receptores de VEGF tales como moléculas pequeñas inhibidoras de las tirosina quinasas de VEGFR e inmunoadhesinas que se unen con Trampa de VEGF. La expresión “antagonista de VEGF”, como se usa en el presente documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen con VEGF y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF. Por lo tanto, la expresión “actividades de VEGF” incluye específicamente actividades biológicas mediadas por VEGF de VEGF.

Las expresiones “actividad biológica” y “biológicamente activo” con respecto a polipéptido de VEGF o “actividad de VEGF” se refieren a propiedades físicas/químicas y funciones biológicas asociadas con VEGF de longitud completa y/o truncada. En ciertas realizaciones, la actividad de VEGF es inductora, estimulante y/o promotora de la angiogénesis. En ciertas realizaciones, la actividad de VEGF es inductora, estimulante y/o promotora de la neovascularización. En ciertas realizaciones, la actividad de VEGF es inductora y/o moduladora de la permeabilidad vascular. En ciertas realizaciones, la actividad de VEGF es inductora, estimulante y/o promotora de la migración de células endoteliales y/o proliferación de células endoteliales.

Los anticuerpos neutralizantes anti VEGF suprimen el crecimiento de una diversidad de líneas celulares tumorales humanas en ratones desnudos (Kim *et al.*, Nature 362: 841-844 (1993); Warren *et al.*, J. Clin. Invest. 95: 1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, Cancer Res. 56: 4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, Cancer Res. 56: 921-924 (1996)) y también inhiben angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinianos isquémicos. Adamis *et al.*, Arch. Ophthalmol. 114: 66-71 (1996).

La expresión “anticuerpo anti VEGF” o “un anticuerpo que se une con VEGF” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con VEGF con suficiente afinidad y especificidad de modo que el anticuerpo es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a VEGF. Por ejemplo, el anticuerpo anti VEGF de la invención puede usarse como un agente terapéutico en la dirección e interferencia con enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de VEGF. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.703.020; documentos WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202, WO 2005/044853; EP 0666868B1; Solicitudes de Patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004); y documento WO2005012359. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte por VEGF. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse con hVEGF con un valor de  $K_d$  de entre 100 nM y 1 pM. Las afinidades de anticuerpos pueden determinarse por un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo de BIAcore como se describe en la Publicación de Solicitud de PCT n.º WO 2005/012359); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo RIA), por ejemplo. El anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como producto terapéutico. Dichos ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y el uso pretendido para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición de HUVEC; ensayos de inhibición de crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y ensayos de citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Patente de Estados Unidos 5.500.362); y actividad agonista o ensayos de hematopoyesis (véase documento WO 95/27062). Un anticuerpo anti VEGF habitualmente no se unirá con otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o VEGF-E, ni otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. En una realización, los anticuerpos anti VEGF incluyen un anticuerpo monoclonal que se une con el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti VEGF humanizado recombinante (véase Presta *et al.* (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599), incluyendo pero sin limitación el anticuerpo conocido como “bevacizumab (BV)”, también conocido como “rhuMab VEGF” o “AVASTIN<sup>®</sup>”. AVASTIN<sup>®</sup> está disponible actualmente en el mercado. Bevacizumab

comprende regiones marco conservadas de IgG<sub>1</sub> humanas mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo murino A.4.6.1 que bloquean la unión de VEGF humano con sus receptores. Aproximadamente 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones marco conservadas, deriva de IgG<sub>1</sub> humana, y aproximadamente 7 % de la secuencia deriva de A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 dalton y está glucosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos humanizados anti VEGF se describen adicionalmente en la Patente de Estados Unidos n.º 6.884.879, expedida el 26 de febrero de 2005. Los anticuerpos anti-VEGF adicionales incluyen los anticuerpos de serie G6 o B20 (por ejemplo, G6-23, G6-31, B20-4.1), como se describe en la Publicación de Solicitud de PCT n.º WO 2005/012359. Para anticuerpos preferidos adicionales véase Patentes de Estados Unidos n.º 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; documentos WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202; EP 0666868B1; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; y Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004).

La expresión “polipéptido de la serie B20” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido, incluyendo un anticuerpo que se une con VEGF. Los polipéptidos de serie B20 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos derivados de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 descritos en la Publicación de Estados Unidos n.º 20060280747, Publicación de Estados Unidos n.º 20070141065 y/o Publicación de Estados Unidos n.º 20070020267, el contenido de estas solicitudes de patente se incorpora expresamente en el presente documento por referencia. En una realización, el polipéptido de serie B20 es B20-4.1 como se describe en la Publicación de Estados Unidos n.º 20060280747, Publicación de Estados Unidos n.º 20070141065 y/o Publicación de Estados Unidos n.º 20070020267. En otra realización, el polipéptido de serie B20 es B20-4.1.1 descrito en la Publicación de PCT n.º WO 2009/073160.

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

Un “factor o agente angiogénico” es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, crecimiento celular endotelial, estabilidad de los vasos sanguíneos, y/o vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia de VEGF (VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D), PIGF, familia de PDGF, familia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos de TIE (Angiopoietinas), efrinas, ligando de tipo delta 4 (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos: ácidos (aFGF) y básicos (bFGF), folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF), interleucina 8 (IL-8), leptina, midquina, neuropilinas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, pleiotropina (PTN), progranulina, proliferina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), etc. También incluiría factores que aceleran la curación de heridas, tales como hormonas del crecimiento, factor de crecimiento de tipo insulina I (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia y TGF-alfa y TGF-beta. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22: 3172-3179; Ferrara y Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12): 1359-1364; Tonini *et al.* (2003) Oncogene 22: 6549-6556 (por ejemplo, Tabla 1 que enumera los factores angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8: 200-206.

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

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos

radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumoricida provoca destrucción de células tumorales.

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

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenestirina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1 y caliqueamicina omega 1 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de integrina alfa 4 oral; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido microfenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), pemetrexed (ALIMTA®); tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostano, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfosfamina; demecolcina; diacuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbacin; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2" tricloretetilamina; tricótenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roudina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacin; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas modificadas técnicamente con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®);

BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteasoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENA SENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase definición posterior); inhibidores de tirosina quinasa (véase definición posterior); inhibidores de serina-treonina quinasa tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente documento incluyen “agentes antihormonales” o “productos terapéuticos endocrinos”, que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, incluyendo, pero sin limitación: antiestrógenos con perfil agonista/antagonista mixto, incluyendo tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, queoxifeno y moduladores del receptor de estrógeno selectivo (SERM), tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (RE), inhibir la unión de ADN, aumentar la renovación de RE y/o suprimir los niveles de RE); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores de aromatasa esteroideos tales como formestano y exemestano (AROMASIN®) e inhibidores de aromatasa no esteroideos tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida y otros inhibidores de aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de hormonas liberadoras de hormona luteinizante, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y triptorelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido transretinoico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa Bv8), bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa Bv8) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen en G1 también se extienden a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.* (W. B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo Europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

“Doxorrubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

La expresión “polipéptido que comprende región Fc” se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (véase definiciones posteriores), que comprende una región Fc. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todo el K447 retirado, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

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

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la

sustancia/molécula, agonista o antagonista para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio más temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

“Refractario” se refiere a la resistencia o ausencia de sensibilidad de una enfermedad o afección a un tratamiento (por ejemplo, el número de células plasmáticas neoplásicas aumenta incluso aunque se proporcione tratamiento). En ciertas realizaciones, el término “refractario” se refiere a una resistencia o ausencia de sensibilidad a cualquier tratamiento previo incluyendo, pero sin limitación, antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos y tratamientos quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el término “refractario” se refiere a una ausencia de sensibilidad intrínseca de una enfermedad o afección a cualquier tratamiento previo que comprende un antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos y/o tratamientos quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF.

“Recidivante” se refiere a la regresión de la enfermedad del paciente de vuelta a su patología anterior, especialmente el regreso de síntomas después de una aparente recuperación o recuperación parcial. En ciertas realizaciones, el estado recidivante se refiere al proceso de volver a o el retorno a enfermedad antes del tratamiento previo incluyendo, pero sin limitación, antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos y/o tratamientos quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el estado recidivante se refiere al proceso de volver a o el retorno a enfermedad después de una respuesta fuerte inicial a una terapia de cáncer que comprende un antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos y/o tratamientos quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF.

El término “eficacia” se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc para producir un efecto deseado. En ciertas realizaciones, la eficacia se refiere al efecto observado máximo de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc a niveles de saturación. En ciertas realizaciones, la eficacia se refiere a la  $CE_{50}$  de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc. En ciertas realizaciones, la eficacia se refiere a la potencia de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc. En ciertas realizaciones, la eficacia se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc para producir efectos beneficiosos en el transcurso o la duración de una enfermedad, incluyendo beneficio clínico como se define en el presente documento.

El término “ $CE_{50}$ ” se refiere a la concentración de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión Fc que induce una respuesta a medio camino entre la línea basal y el máximo. En ciertas realizaciones,  $CE_{50}$  representa la concentración de una inmunoglobulina, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc en la que se observa el 50 % de su efecto máximo. En ciertas realizaciones, la  $CE_{50}$  representa la concentración en plasma o suero requerida para obtener el 50 % del efecto máximo *in vivo*.

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

El beneficio clínico puede medirse evaluando diversos criterios de valoración, por ejemplo, inhibición, en algún grado, de la progresión de enfermedad, incluyendo ralentización y detención completa; reducción del número de episodios de enfermedad y/o síntomas; reducción en el tamaño de la lesión; inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células de enfermedad en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; inhibición (es decir reducción, ralentización o detención completa) de propagación de la enfermedad; reducción de la respuesta autoinmunitaria, que puede dar como resultado, aunque no es necesario, la regresión o anulación de la lesión de enfermedad; alivio, en algún grado, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; aumento de la longitud de la presentación sin enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, supervivencia sin progresión; aumento de la supervivencia general; mayor velocidad de respuesta; y/o mortalidad reducida en un punto temporal dado después del tratamiento.

Por "terapia de mantenimiento" se entiende un régimen terapéutico que se proporciona para reducir la probabilidad de reaparición o progresión de enfermedad. Puede proporcionarse terapia de mantenimiento durante cualquier periodo de tiempo, incluyendo periodos de tiempo prolongados hasta la vida del sujeto. Puede proporcionarse terapia de mantenimiento después de terapia inicial o junto con terapias iniciales o adicionales. Las dosificaciones usadas para terapia de mantenimiento pueden variar y pueden incluir dosificaciones disminuidas en comparación con dosificaciones usadas para otros tipos de terapia.

La "terapia adyuvante" en el presente documento se refiere a terapia proporcionada después de cirugía, en la que no puede detectarse ninguna prueba de enfermedad residual, para reducir el riesgo de reaparición de enfermedad. El objetivo de la terapia adyuvante es evitar la reaparición del cáncer, y por lo tanto reducir la posibilidad de muerte relacionada con cáncer.

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

El término "simultáneamente" o "concurrentemente" se usa en el presente documento para hacer referencia a la administración de dos o más agentes terapéuticos, en los que al menos parte de la administración se solapa en el tiempo. En consecuencia, la administración simultánea incluye un régimen de dosificación cuando la administración de uno o más agentes continúa después de detener la administración de uno o más de otros agentes.

Una "muestra biológica" (denominada indistintamente "muestra" o "muestra tisular o celular") abarca una diversidad de tipos de muestra obtenidas de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o supervisión. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras tisulares sólidas tales como muestra de ensayo de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos, y la descendencia de los mismos. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento con respecto a ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o inclusión en una matriz semisólida o sólida para fines de corte. La expresión "muestra biológica" abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, líquido biológico y muestras tisulares. La fuente de la muestra biológica puede ser un tejido sólido como de una muestra orgánica o tisular o biopsia o aspirado nuevo, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o el desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no se entremezclan de forma natural con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Para los fines del presente documento una "sección" de una muestra tisular se entiende como una única parte o trozo de una muestra tisular, por ejemplo, un corte fino de tejido o células cortadas de una muestra tisular. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras tisulares y someterse a análisis de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, la misma sección de muestra tisular se analiza a los niveles tanto morfológico como molecular, o se analiza con respecto tanto a proteína como a ácido nucleico.

La expresión "formulación farmacéutica", "composición farmacéutica" o "formulación terapéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permita que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contenga ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todo microorganismo vivo y sus esporas.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que se conjuga o se fusiona directamente o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que se conjuga o fusiona. El marcador puede en sí mismo ser detectable (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto sustrato o composición que es detectable.

Los "vehículos" como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y

## PLURONICS™.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

*Composiciones*

Los anticuerpos anti Bv8 de la invención son preferentemente monoclonales. También están abarcados dentro del alcance de la invención fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F (ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos anti Bv8 proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse por técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines de diagnóstico y terapéuticos expuestos posteriormente.

Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos monoclonales anti Bv8 de la invención pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinantes (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente con la proteína usada para inmunización. Pueden inducirse anticuerpos para Bv8 en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de Bv8 y un adyuvante. Puede prepararse Bv8 usando métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, se describe posteriormente producción recombinante de Bv8 humano y de ratón. En una realización, los animales se inmunizan con un Bv8 fusionado con la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización preferida, los animales se inmunizan con una proteína de fusión Bv8-IgG1. Los animales habitualmente se inmunizan contra conjugados inmunogénicos o derivados de Bv8 con monofosforil lípido A (MPL)/trehalosa dicrionomicolato (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas después los animales se refuerzan. De 7 a 14 días después se extrae sangre de los animales y el suero se ensaya con respecto a título anti Bv8. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza.

Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después se fusionan linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

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

Son células de mieloma preferidas las que se fusionan eficazmente, apoya la producción de alto nivel estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, son líneas celulares de mieloma preferidas líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California Estados Unidos y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se cultivan células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra Bv8. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

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

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

Los anticuerpos anti Bv8 de la invención pueden prepararse usando bibliotecas combinatorias para explorar con respecto a clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o las actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan explorando bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionados con proteínas de la cubierta del fago. Dichas bibliotecas de fagos se seleccionan por cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Se adsorben clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse con el antígeno deseado en el antígeno y de este modo se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones de unión se eluyen después del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 de la invención pueden obtenerse diseñando un procedimiento de exploración de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de construcción de un clon de anticuerpo anti Bv8 de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y las secuencias de región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo está formado por dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse funcionalmente en fago, bien como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están unidos covalentemente mediante un péptido flexible, corto, o como fragmentos Fab, en los que se fusionan cada uno con un dominio constante e interaccionan de forma no covalente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fagos que codifican scFv y clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones de Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden explorarse con respecto a clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio no tratado previamente puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para una amplia serie de antígenos ajenos y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden realizarse de forma sintética bibliotecas sin tratamiento previo clonando los segmentos de gen V no reordenados de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir reordenación *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

El fago filamentoso se usa para presentar fragmentos de anticuerpos por fusión con la proteína de cubierta menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena está fusionada con pIII y la otra se secreta al periplasma de células hospedadoras bacterianas donde el ensamblaje de una estructura de proteína de cubierta-Fab se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de cubierta de tipo silvestre, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, se obtienen ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca desviada a favor de clones anti Bv8, el individuo se inmuniza con Bv8 para generar una respuesta de anticuerpo, y se recuperan células del bazo y/o linfocitos B en circulación y otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para construcción de bibliotecas. En una realización preferida, una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano desviada a favor de clones anti Bv8 se obtiene generando una respuesta de anticuerpo anti Bv8 en ratones transgénicos que portan una matriz génica de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógeno funcional) de modo que la inmunización de Bv8 da lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos contra Bv8. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe posteriormente.

Puede obtenerse enriquecimiento adicional con respecto a poblaciones celulares reactivas anti Bv8 usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de Bv8, por ejemplo, por separación celular con cromatografía de afinidad de Bv8 o adsorción de células a Bv8 marcado con fluorocromo seguido de clasificación de células activadas por flujo (FACS).

Como alternativa, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que Bv8 no sea antigénico. Para bibliotecas que incorporan construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se recogen células madre del individuo para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse de una diversidad de especies animales, tales como especies humana, de ratón, de rata, lagomorfos, luprinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas y aviares, etc.

Se recuperan ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes variables de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), realizando este modo diversos repertorios de genes V para expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos alojados dentro del segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden alojarse en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degradación en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). Preferentemente, la diversidad de biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia del gen V para amplificar todas las ordenaciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de célula inmunitaria, por ejemplo como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de PCR como un marcador en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o por amplificación por PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

Pueden derivarse repertorios de genes V reordenados de forma sintética *in vitro* a partir de segmentos génicos de V. La mayoría de los segmentos génicos de VH humanos se han clonado y secuenciado (presentado en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y se ha mapeado (presentado en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden realizarse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia centrada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos Vk y Vλ humanos (presentado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una serie de pliegues VH y VL, y tramos L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de ADN que codifican genes V, los segmentos de genes V de línea germinal pueden reordenarse *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios de genes VH y VL entre sí de varias maneras. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite sobre el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Se clonan por separado repertorios de VH y VL sin tratamiento previo, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos bibliotecas se combinan después por infección con fagos de bacterias que contienen fagémidos, de modo que cada célula contiene una diferente combinación y el tamaño de biblioteca se limita solamente por el número de células presentes (aproximadamente  $10^{12}$  clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se combinan en un único replicón y se empaquetan juntos en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^8$  M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse entre sí mediante PCR y después clonarse, por ejemplo como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). También puede usarse ensamblaje de PCR para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para

formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más, se usa “ensamblaje de PCR en célula” para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y después clonar repertorios de genes ligados como se describe en Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

5 Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratamiento previo (bien naturales o bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  M<sup>-1</sup>), pero la maduración de afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), mencionado anteriormente. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (presentada en Leung *et al.*, Technique, 1: 11-15. (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, puede realizarse maduración de afinidad mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo usando PCR con cebadores que portan una secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y explorando con respecto a clones de mayor afinidad. El documento WO 96/07754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un método para inducir mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación en fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorar con respecto a mayor afinidad en varios ciclos de redistribución de cadenas como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10 : 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de  $10^{-9}$  M.

Se conocen en la técnica secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de Bv8, por ejemplo, en Wechselberger *et al.* (FEBS Lett 462: 177-181 (1999)) y Li *et al.* (Mol Pharm. 59: 692-698 (2001)). Pueden prepararse ácidos nucleicos que codifican Bv8 por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, síntesis química por cualquiera de los métodos descritos en Engels *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tales como los métodos de triéster, fosfita, fosforamidita y H-fosfonato. En una realización, se usan codones preferidos por la célula hospedadora de expresión en el diseño de ADN que codifica Bv8. Como alternativa, puede aislarse ADN que codifica el Bv8 de una biblioteca de ADNc o genómica.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el Bv8, la molécula de ADN se une operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, en el que la secuencia de control se reconoce por una célula hospedadora transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Se conocen en la técnica vectores adecuados para expresión en células hospedadoras procariontas y eucariotas y algunos se describen adicionalmente en el presente documento. Pueden usarse organismos eucariotas, tales como levaduras, o células derivadas de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica el Bv8 está unido operativamente con una secuencia líder secretora que da como resultado la secreción del producto de expresión por la célula hospedadora al medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líderes secretoras incluyen stII, ecotin, lamB, GD de herpes, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuada, para su uso en el presente documento, la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen *et al.*, EMBO J., 4: 3901 (1985)).

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

La transfección se refiere a la captura de un vector de expresión por una célula hospedadora tanto si se expresa de hecho cualquier secuencia codificante como si no. Los expertos habitualmente en la materia conocen numerosos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación con CaPO<sub>4</sub> y electroporación. La transfección exitosa se reconoce en general cuando se produce cualquier indicio de la operación de este vector dentro de la célula hospedadora. Se conocen bien en la técnica métodos para transfección y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

La transformación significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o bien mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, se realiza transformación usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. Se conocen bien en la técnica métodos para transformación, y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

Las células hospedadoras procariontas usadas para producir el Bv8 pueden cultivarse como se describe en general en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

65

Las células hospedadoras de mamífero usadas para producir el Bv8 pueden cultivarse en una diversidad de medios, que se conocen bien en la técnica y algunos de los cuales se describen en el presente documento.

5 Las células hospedadoras referidas en la presente divulgación abarcan células en cultivo *in vitro* así como células que están dentro de un animal hospedador.

Puede conseguirse purificación de Bv8 usando métodos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

10 El Bv8 purificado puede estar unido a una matriz adecuada tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de hidroxil metacrilato, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nylon, vehículos neutros e iónicos, y similares, para su uso en la separación cromatográfica por afinidad de clones de presentación en fagos. Puede conseguirse unión de la proteína Bv8 con la matriz mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica empleada habitualmente para unir  
15 ligandos proteicos a matrices de polisacáridos, por ejemplo agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del vehículo con haluros de cianógeno y posterior acoplamiento de las aminas alifáticas o aromáticas primarias del ligando peptídico con la matriz activada.

20 Como alternativa, puede usarse Bv8 para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en clasificación celular, o conjugarse con biotina para captura con perlas recubiertas con estreptavidina, o usarse en cualquier otro método conocido en la técnica para seleccionar bibliotecas de presentación en fagos.

25 Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con Bv8 inmovilizado en condiciones adecuadas para unión de al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen por ácido, por ejemplo como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición por antígeno de Bv8, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse de 20 a 1.000 veces en un único ciclo de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a ciclos adicionales de selección.

35 La eficiencia de selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago pueden interaccionar simultáneamente con el antígeno. Pueden conservarse anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta diversidad no solamente estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de  
40 unión) puede promoverse mediante el uso de largos lavados y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass *et al.*, *Proteínas*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

45 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para Bv8. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de afinidad descritas anteriormente) probablemente dé lugar a muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con Bv8 limitante, podrían separarse por competición fagos de alta afinidad poco habituales. Para conservar todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con un exceso de Bv8 biotinilado, pero con el Bv8 biotinilado a una  
50 concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para Bv8. Los fagos de unión de alta afinidad pueden después capturarse por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con tan poco como una afinidad dos veces mayor de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden  
55 manipularse para diferenciar basándose en la cinética de disociación.

Los clones de Bv8 pueden seleccionarse por actividad. En una realización, la invención proporciona anticuerpos de Bv8 que bloquean la unión entre un Bv8 y su ligando (por ejemplo, receptores de Bv8 PKR1 y PKR2). Los clones de Fv correspondientes a dichos anticuerpos de Bv8 pueden seleccionarse (1) aislando clones de Bv8 de una biblioteca  
60 de fagos como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos cultivando la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) seleccionando Bv8 y una segunda proteína contra la que se desea actividad de bloqueo y no de bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti Bv8 con Bv8 inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a Bv8 que solapen o se compartan con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, pueden enriquecerse adicionalmente clones con las propiedades de bloqueo/no de bloqueo deseadas repitiendo los  
65

procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

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

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como ser humano) y después fusionado con ADN de región constante de otra especie animal para formar una secuencia o secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa, "híbrida", se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En una realización preferida, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humana para formar secuencia o secuencias codificantes para todas las cadenas pesadas y/o ligeras humanas, de longitud completa o parcial.

También puede modificarse ADN que codifica anticuerpo anti Bv8 derivado de un hibridoma de la invención, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un hibridoma o anticuerpo derivado de clon de Fv o fragmento puede modificarse adicionalmente uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados de clon de hibridoma de la invención.

### Fragmentos de anticuerpos

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos pueden generarse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias existen ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden aislarse fragmentos de anticuerpos de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos de Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedadoras recombinante. Se describen fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítopos de unión a receptor de recuperación en la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la materia. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patentes de Estados Unidos n.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistas de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuadas para unión no específica reducida durante uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión scFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o el carboxilo de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

### Anticuerpos humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar

anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988). *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta después como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901. Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véase, por ejemplo, Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623.

Es en general deseable además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles habitualmente y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptora e importada de modo que se consigue la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

#### *Anticuerpos humanos*

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

Es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse combinación de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, en la que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que se denomina también "impronta epitópica", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la retirada de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo domina (impronta) la elección del

compañero de cadena humana. Cuando el proceso se repite para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injertos de HVR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o HVR de origen no humano.

5

#### *Anticuerpos multiespecíficos*

Un ejemplo de un anticuerpo multiespecífico de la presente invención incluye un anticuerpo que se une con Bv8 y con otro antígeno. En otras realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse con dos epítopos diferentes de Bv8. También pueden usarse anticuerpos multiespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan Bv8. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a Bv8 y una rama que se une con un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, antiinterferón  $\alpha$ , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos multiespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ).

15

Se han descrito en la técnica diversos métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Uno de los primeros enfoques implicó la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

20

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1) está presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto posibilita una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son de importancia particular.

25

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se ha descubierto que esta estructura simétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solamente en una mitad de la molécula biespecífica posibilita un modo sencillo de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

30

De acuerdo con otro enfoque, la tecnología de "botón en ojal" o "KnH" se refiere a una tecnología que se dirige al emparejamiento de dos polipéptidos entre sí *in vitro* o *in vivo* introduciendo una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfaz en la que interaccionan. Por ejemplo, se han introducido KnH en las interfaces de unión Fc:Fc, interfaces CL:CH1 o interfaces VH/VL de anticuerpos (por ejemplo, documentos US20007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.* (1997) *Protein Science* 6: 781-788). Esto es especialmente útil en la conducción del emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes entre sí durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen KNH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables individuales unidos a cada región Fc, o comprenden además diferentes dominios variables de cadena pesada que se emparejan con dominios variables de cadena ligera similares o diferentes. De acuerdo con una realización, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

35

Los anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980) y para tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089).

40

Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen agentes y técnicas de reticulación adecuados (por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980).

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos multiespecíficos de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo de ditiol arsenita sódica para estabilizar ditiolos cercanos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula  $F(ab')_2$  de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas tumorales de mama humanas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al*, J. Immunol, 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios VH y VL de un fragmento a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

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

#### Anticuerpos multivalentes

Puede internalizarse un anticuerpo multivalente (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales de la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión al antígeno. En una de dichas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender  $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ , en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

*Anticuerpos de un único dominio*

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti Bv8 de la invención es un anticuerpo de un único dominio. Un anticuerpo de un único dominio es una sola cadena polipeptídica sencilla que comprende todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de un único dominio consiste en todo o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

*Variantes de anticuerpos*

En algunas realizaciones, se contemplan modificación o modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza esa secuencia.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo más u otras variantes en, o en lugar de, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo de una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o reducir el grado en el que el anticuerpo está glucosilado. La glucosilación de polipéptidos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Se consigue adición o supresión de sitios de glucosilación al anticuerpo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición, supresión o sustitución de uno o más restos de serina o treonina de la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

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

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

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

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

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la hace un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc del anticuerpo se miden para asegurar que solamente se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (que carece por lo tanto probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcγRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan Fc(γRIII) solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(γRI, Fc(γRII y Fc(γRIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo. (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M. S. *et al.*, Blood 101: 1045-1052 (2003); y Cragg, M. S. y M. J. Glennie, Blood 103: 2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcγRn y semivida/eliminación *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S. B. *et al.*, Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones preferidas”. Se proporcionan más cambios sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares” en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos explorarse, por ejemplo, con respecto a una actividad deseada, tal como unión a antígeno mejorada, inmunogenicidad reducida, ADCC o CDC mejorada, etc.

TABLA 1

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

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

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), Su (H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en propiedades de cadenas laterales comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación con el anticuerpo parental del que se generaron. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración de afinidad basadas en presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de cubierta de fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión). Para identificar sitios de regiones hipervariables candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración (por ejemplo, exploración de alanina) para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una

estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en este campo, incluyendo las detalladas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración usando técnicas conocidas en este campo, incluyendo las descritas en el presente documento, y pueden seleccionarse variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida) mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

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

De acuerdo con la presente descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos conservarían no obstante las mismas características requeridas para utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden realizarse ciertas alteraciones en la región Fc que darían como resultado unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); Patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; Patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y documento WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, también, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Se describen variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o reducida en la Patente de Estados Unidos n.º 6.194.551B1, documento WO99/51642. Véase también, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

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

En otro aspecto más, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo, "tioMab", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos aparecen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos restos con cisteína, se sitúan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos farmacológicos o restos farmacológicos-enlazador, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos pueden sustituirse con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada.

#### *Derivados de anticuerpos*

Los anticuerpos anti Bv8 de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente. Preferentemente, los restos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli (n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si están unidos más de un polímero, pueden

ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones incluyendo, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpos se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

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

#### *Ensayos de actividad*

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti Bv8 de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la modulación de uno o más aspectos de efectos asociados a Bv8, incluyendo pero sin limitación unión a Bv8, proliferación de células endoteliales mediadas por Bv8, metástasis tumoral.

En ciertas realizaciones de la invención, las inmunoglobulinas producidas en el presente documento se analizan con respecto a su actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la presente invención se ensayan con respecto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directa o competitiva usando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Se proporciona posteriormente un ensayo de unión a antígeno ilustrativo en la sección de Ejemplos.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, pero sin limitación, secuenciación N terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla anticuerpos alterados que poseen algunas pero no todas las funciones efectoras, que los hacen candidatos deseados para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida se miden para asegurar que solamente se mantengan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (que carece por lo tanto probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, linfocitos NK, expresan Fc (RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc (RI, Fc(RII) y Fc(RIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos alterados que poseen funciones efectoras aumentadas y/o semivida aumentada. Véase por ejemplo, Solicitud de Estados Unidos n.º 12/577.967.

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

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula

hospedadora para usar. En general, las células hospedadoras preferidas son de origen procarionta o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

5 a. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariontas:

*i. Construcción de vectores*

10 Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención usando técnicas recombinantes convencionales. Pueden aislarse secuencias polinucleotídicas deseadas y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar  
 15 polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariontas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

25 En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y de este modo proporcionan medios sencillos para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros  
 30 plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.648.237.

35 Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicación y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tales como λGEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

40 El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de cistrón-promotor, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariontas típicamente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo la presencia o  
 45 ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conocen bien un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la  
 50 secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

55 Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariontas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas de promotor de β-galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor de tac o el de trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo a un experto en la materia unirlos operativamente a cistrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para aportar  
 60 cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana.  
 65 En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin de la presente invención debería ser

una que se reconozca y procese (es decir escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las señales de secuencia nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede suceder en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistron. A este respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli* trxB-) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de subunidades proteicas expresadas. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos gram negativos o gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), Bacilli (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gram negativas. En una realización, se usan células de *E. coli* como hospedadores para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; n.º de depósito de ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110  $\Delta$ hfuA ( $\Delta$ tonA) ptr3 lac Iq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de Estados Unidos n.º 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). Es necesario en general seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse convenientemente *E. coli*, *Serratia* o especies de *Salmonella* como el hospedador cuando se usen plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para aportar el replicón. Típicamente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y pueden incorporarse convenientemente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

#### ii. Producción de anticuerpos

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, se realiza transformación usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es electroporación.

Se cultivan células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención en medio conocido en la técnica y adecuado para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo luria (LB) más complementos nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a medio para crecimiento de células que expresan genes de resistencia a ampicilina.

También puede incluirse cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotreitrol y ditiotreitrol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, aún más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4,

y más preferentemente aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, se induce expresión de la proteína en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio con fosfato limitante para inducción. Preferentemente, el medio con fosfato limitante es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Puede usarse una diversidad de inductores adicionales, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan a y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas típicamente implica alterar el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se han roto, los residuos celulares o las células completas pueden retirarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse en él. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo que se filtra y concentra para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos habitualmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades por un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación semicontinuos a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1.000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1.000 litros a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan turbinas agitadoras para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a fermentación en un fermentador que es de no más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteína se inicia típicamente después de haberse cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una diversidad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y el plegamiento apropiados de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas de Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse ciertas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes en proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.* (1998), mencionado anteriormente; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

En una realización, se usan cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y se transforman con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospedadoras en el sistema de expresión de la invención.

### iii. Petrificación de anticuerpos

Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en

una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex® G-75.

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmutafinidad de los productos de anticuerpos de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad con la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como la primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica a la fase sólida con proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a proteína A. La fase sólida se lava después para retirar contaminantes unidos de forma no específica a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

b. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas:

Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes; una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) *Componente de secuencia señal*

Un vector para uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o el polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) *Origen de replicación*

En general, un componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse típicamente solamente porque contiene el promotor temprano.

(iii) *Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea relevante, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC® CRL-9096).

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

*(iv) Componente de promotor*

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico polipeptídico del anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Los genes prácticamente aleucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del inicio de la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEQ ID NO: 206) en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 207) que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptidos de anticuerpos de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de activa o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Como alternativa, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous puede usarse como el promotor.

*(v) Componente de elemento potenciador*

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, a-fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador también puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de polipéptidos de anticuerpos, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

*(vi) Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas también contendrán típicamente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente en las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

*(vii) Selección y transformación de células hospedadoras*

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras mamíferas útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC® CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC® CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC® CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO- 76, ATCC® CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC® CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC® CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC® CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC® CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

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

5 (viii) *Cultivo de las células hospedadoras*

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30.985 como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato) tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

(ix) *Purificación de anticuerpos*

25 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, o directamente secretarse al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar generalmente usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

35 La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basen en cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para  $\gamma 3$  humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía en SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

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

55 Inmunoconjugados

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

65 Se han usado inmunoconjugados para suministro local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben el crecimiento o la proliferación de células, en el tratamiento de cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opin. in Pharmacology 5: 543-549; Wu *et al* (2005) Nature Biotechnology 23 (9): 1137-1146; Payne, G. (2003) i 3: 207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv.

Rev. 26: 151-172; patente de Estados Unidos n.º 4.975.278). Los inmunocombinados permiten el suministro dirigido de un resto farmacológico a un tumor, y la acumulación intracelular en el mismo, en el que la administración sistémica de fármacos no combinados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como las células tumorales que se busca eliminar. (Baldwin *et al.*, Lancet (15 Mar. 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera *et al.*, eds) pp. 475-506. Se ha indicado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21: 183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en combinados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al* (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92 (19): 1573-1581; Mandler *et al* (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler *et al* (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al* (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman *et al* (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen la unión a tubulinas, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o ser menos activos cuando se combinan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un combinado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$  unido con un quelante-enlazador de tiourea (Wiseman *et al* (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27 (7): 766-77; Wiseman *et al* (2002) Blood 99 (12): 4336-42; Witzig *et al* (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10): 2453-63; Witzig *et al* (2002) J. Clin. Oncol. 20 (15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no de Hodgkin (NHL) de linfocitos B, su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (ozogamicina de gemtuzumab, Wyeth Pharmaceuticals), un combinado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo huCD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25 (7): 686; patentes de Estados Unidos n.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). La mertansina de cantuzumab (Immunogen, Inc.), un combinado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC242 unido mediante el enlazador disulfuro SPP con el resto farmacológico de maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cánceres de colon, pancreáticos, gástricos, y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un combinado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal antiantígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto farmacológico de maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se combinaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos de CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina *et al* (2003) Nature Biotechnol. 21 (7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En ciertas realizaciones, un inmunocombinado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente) agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunocombinados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ . Se preparan combinados del anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HC1), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazono (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietiltriampinopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para combinación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

También se contemplan en el presente documento combinados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

#### Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunocombinado comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos)

conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano oriental *Maytenus serrata* (patente de Estados Unidos n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de Estados Unidos n.º 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo en las patentes de Estados Unidos n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos farmacológicos de maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en conjugados de fármacos de anticuerpos porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante los enlazadores distintos de disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra una diversidad de líneas celulares tumorales.

Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos, y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.208.020, 5.416.064 y patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une con un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une con el oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado farmacológico alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

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

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992), y solicitud de patente de Estados Unidos n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente de enlazador SMCC como se desvela en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos de tioéter, grupos lábiles por ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por estearasa, como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Se describen y ejemplifican en el presente documento grupos de enlace adicionales.

Pueden prepararse conjugados de anticuerpo y maitansinoide usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse con la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un

grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

#### Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos de dolastatina y derivados, las auristatinas (patentes de Estados Unidos n.º 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámicas de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45 (12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2961-2965). El resto farmacológico de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo mediante el extremo N (amino) terminal o el extremo C (carboxilo) terminal del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen los restos farmacológicos de monometilauristatina ligados al extremo N terminal DE y DF, desvelados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Estados Unidos n.º de serie 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

Típicamente, pueden prepararse restos farmacológicos basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química peptídica. Los restos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: documentos US 5635483; US 5780588; Pettit *et al* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; Pettit *et al* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit, G.R., *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit *et al* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5: 859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21 (7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Estados Unidos n.º de serie 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

#### Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación,  $\gamma$ 11,  $\alpha$ 21,  $\alpha$ 31, N-acetil- $\gamma$ 11, PSAG y  $\theta$ 11 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

#### Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descritos en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos sin unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

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

Para destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo  $^{99m}Tc$  o  $^{1123}In$ , o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, irm), tales como yodo-123 de nuevo, yodo-131,

indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

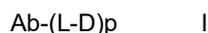
Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno.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

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HC1), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilentriaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácidos, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

Los compuestos contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos). Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

#### Preparación de conjugados farmacológicos de anticuerpos

En los conjugados farmacológicos de anticuerpos (ADC), un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias vías, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo de enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.



El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen componentes de enlazadores adicionales en la técnica y se describen algunos en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Estados Unidos n.º de serie 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes de enlazadores de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente de enlazador de aminoácidos incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes enlazadores de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una plasmína proteasa.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadenas laterales, por ejemplo lisina, (iii) grupos tioles de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir enlaces de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que da como resultado la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos de tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

También pueden producirse conjugados farmacológicos de anticuerpos mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos de bases de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen restos serina o treonina N terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en predirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de clarificación y después administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

Composiciones de la invención

La presente invención también abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti Bv8, y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo anti Bv8. Como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen con Bv8, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen con Bv8. Estas composiciones pueden comprender además vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica.

Se preparan formulaciones terapéuticas que comprenden anticuerpo anti Bv8 de la invención para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20ª edición (2000)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas y otras secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico, alquilparabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades

que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden inmovilizarse en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metil-metacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000).

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Eso se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de L-ácido glutámico, y  $\gamma$  etil-L-glutamato, etilen-vinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinilacetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Usos

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

La invención proporciona métodos y composiciones útiles para modular patologías asociadas con la expresión y/o actividad de Bv8, tales como expresión y/o actividad aumenta o expresión y/o actividad indeseada, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo anti Bv8 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti Bv8 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti Bv8 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la metástasis tumoral, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti Bv8 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti Bv8 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para potenciar la eficacia de otro agente antiangiogénico, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti Bv8 a un individuo que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el otro agente antiangiogénico se dirige a VEGF, por ejemplo un anticuerpo anti VEGF.

Se entiende que puede usarse cualquier anticuerpo anti Bv8 adecuado en métodos de tratamiento, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con afinidad madurada, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se usa para tratamiento cualquier anticuerpo anti Bv8 descrito en el presente documento.

En cualquiera de los métodos del presente documento, se puede administrar al sujeto o paciente junto con el anticuerpo anti Bv8 del presente documento una cantidad eficaz de un segundo medicamento (en el que el anticuerpo anti Bv8 del presente documento es el primer medicamento), que es otro agente activo que puede tratar

la afección en el sujeto que requiere tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con otro anticuerpo, agente o agentes quimioterapéuticos (incluyendo cocteles de agentes quimioterapéuticos), agente o agentes antiangiogénicos, agente o agentes inmunosupresores, citocina o citocinas, antagonista o antagonistas de citocinas y/o agente o agentes inhibidores del crecimiento. El tipo de dicho segundo medicamento depende de diversos factores, incluyendo el tipo de trastorno, la gravedad de la enfermedad, la condición y edad del paciente, el tipo y la dosis del primer medicamento empleado, etc.

Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, por ejemplo, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede combinarse con un agente antiangiogénico, tal como un anticuerpo anti VEGF (por ejemplo, AVASTIN®) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo anticuerpo anti-HER2 trastuzumab HERCEPTIN® o inhibidor de EGFR (por ejemplo, erlotinib (TARCEVA®)) o un anticuerpo anti-HER2 que se une con el dominio II de HER2, tal como anticuerpo anti-HER2 pertuzumab OMNITARG™) en un esquema de tratamiento, por ejemplo en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. Como alternativa, o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo irradiación de haz externo o terapia con un agente marcado con radiactividad, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de y/o después de la administración de la terapia o las terapias adjuntas. Además, se espera que la combinación de un anticuerpo de la presente invención con un agente relativamente no citotóxico tal como otra molécula biológica, por ejemplo otro anticuerpo, reduzca la citotoxicidad frente a la combinación del anticuerpo con un agente quimioterapéutico de otro agente que es altamente tóxico para células.

El tratamiento con una combinación del anticuerpo del presente documento con uno o más segundos medicamentos preferentemente da como resultado una mejora en las señales o síntomas de cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede dar como resultado una mejora de la supervivencia (supervivencia general y/o supervivencia sin progresión) en relación con un paciente tratado con el segundo medicamento solamente (por ejemplo, solamente un agente quimioterapéutico) y/o puede dar como resultado una respuesta objetiva (parcial o completa). Además, el tratamiento con la combinación de un anticuerpo del presente documento y uno o más segundos medicamentos preferentemente da como resultado un beneficio terapéutico aditivo, y más preferentemente sinérgico (o mayor que el aditivo), al paciente. En ciertas realizaciones, el tiempo entre al menos una administración del segundo medicamento y al menos una administración del anticuerpo del presente documento es de aproximadamente un mes o menos. En ciertas realizaciones, el tiempo entre al menos una administración del segundo medicamento y al menos una administración del anticuerpo del presente documento es de aproximadamente dos semanas o menos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo del presente documento y el segundo medicamento se administran simultáneamente.

Para tratamiento de cánceres, el segundo medicamento es preferentemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), agente antiangiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, corticosteroide, antiemético, vacuna de cáncer, analgésico, agente antiavascular y/o agente inhibidor del crecimiento. El agente citotóxico incluye un agente que interacciona con ADN, los antimetabolitos, los inhibidores de topoisomerasa I o II, o el inhibidor del huso o agentes estabilizantes (por ejemplo, preferentemente alcaloide de la vinca, más preferentemente seleccionado de vinblastina, desoxivinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vinepidina, vinfosiltina, vinzolidina y vinfunina) o cualquier otro agente usado en quimioterapia tal como 5-FU, un taxano, doxorubicina o dexametasona.

En algunas realizaciones, el segundo medicamento es otro anticuerpo usado para tratar cánceres tales como los dirigidos contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, por ejemplo, trastuzumab, o uno de sus fragmentos funcionales, inhibidor de pan-HER, un inhibidor de Src, un inhibidor de MEK, o un inhibidor de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR (tal como uno que inhibe la actividad tirosina quinasa del EGFR), tal como cetuximab (ERBITUX®), dianilinoftalimidias, pirazolo o pirrolopiridopirimidinas, quinazilinas, gefitinib, erlotinib, cetuximab, ABX-EFG, canertinib, EKB-569 y PKI-166), o inhibidor de EGFR/HER-2 doble tal como lapatanib. Los segundos medicamentos adicionales incluyen los anticuerpos alemtuzumab (CAMPATH™), FavID (IDKLH), CD20 con glucosilación alterada, tal como GA-101/GLYCART™, oblimersen (GENASENSE™), talidomida y análogos de la misma, tales como lenalidomida (REVLIMID™), imatinib, sorafenib, ofatumumab (HUMAX-CD20™), anticuerpo anti-CD40, por ejemplo SGN-40, y anticuerpo anti-CD-80, por ejemplo galiximab.

El agente antiemético es preferentemente clorhidrato de ondansetrón, clorhidrato de granisetron, metoclopramida, domperidona, aloperidol, ciclizina, lorazepam, proclorperazina, dexametasona, levomepromazina, o tropisetron. La vacuna es preferentemente ADN de GM-CSF y vacunas basadas en células, vacuna de células dendríticas, vacunas virales recombinantes, vacunas de proteínas de choque térmico (HSP), vacunas de tumores alogénicos o autólogos. El agente analgésico es preferentemente ibuprofeno, naproxeno, trisalicilato de magnesio de colina o clorhidrato de oxicodona. El agente antiavascular es preferentemente bevacizumab, o rhuMab-VEGF. Los segundos medicamentos adicionales incluyen agentes proliferativos tales como inhibidores de farnesilo proteína transferasa, inhibidores anti

VEGF, inhibidores de p53 o inhibidores de PDGFR. El segundo medicamento del presente documento incluye también terapia de diana biológica tal como tratamiento con anticuerpos así como terapia de diana molecular pequeña, por ejemplo, contra ciertos receptores.

5 Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y se conocen en la técnica, incluyendo los enumerados en el presente documento, por ejemplo, enumerados bajo Definiciones y, por ejemplo, en Carmeliet y Jain, Nature 407: 249-257 (2000); Ferrara *et al.*, Nature Reviews: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8: 200-206 (2003). Véase también solicitud de patente de Estados Unidos US20030055006. En una realización, un anticuerpo anti Bv8 se usa en combinación con un anticuerpo neutralizante anti VEGF (o fragmento) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista de receptor de VEGF incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, fragmentos de receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos anti VEGFR neutralizantes, inhibidores de bajo peso molecular de VEGFR tirosina quinasas (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF, variantes antagonistas de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o adicionalmente, pueden coadministrarse opcionalmente dos o más inhibidores de la angiogénesis al paciente además de antagonistas de VEGF y otro agente. En ciertas realizaciones, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes antineoplásicos, en combinación con anticuerpo anti Bv8, el antagonista de VEGF y un agente antiangiogénico.

20 Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en el presente documento, por ejemplo, en la definición de "agente quimioterapéutico".

25 Dichos segundos medicamentos pueden administrarse en un periodo de 48 horas después de administrarse los anticuerpos del presente documento, o en un periodo de 24 horas, o en un periodo de 12 horas o en un periodo de 3-12 horas después de dicho agente, o pueden administrarse durante un periodo de tiempo preseleccionado, que es preferentemente de aproximadamente de 1 a 2 días. Además, la dosis de dicho agente puede ser subterapéutica.

30 Los anticuerpos del presente documento pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o alternando con el segundo medicamento o tras la ausencia de sensibilidad con otra terapia. Por lo tanto, la administración combinada de un segundo medicamento incluye coadministración (administración simultánea) usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras ambos (o todos los) medicamentos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Todos estos segundos medicamentos pueden usarse en combinación entre sí o consigo mismos con el primer medicamento, de modo que la expresión "segundo medicamento" como se usa en el presente documento no significa que sea el único medicamento aparte del primer medicamento, respectivamente. Por lo tanto, no es necesario que el segundo medicamento sea un medicamento, sino que puede constituir o comprender más de uno de dichos fármacos.

40 Estos segundos medicamentos como se expone en el presente documento se usan en general en las mismas dosificaciones y con las mismas vías de administración que los primeros medicamentos, o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones de los primeros medicamentos. Si dichos segundos medicamentos se usan en absoluto, preferentemente, se usan en cantidades menores que si no estuvieran presentes los primeros medicamentos, especialmente en dosificaciones posteriores más allá de la dosificación inicial con el primer medicamento, para eliminar o reducir los efectos secundarios provocados por el mismo.

45 La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir el tumor refractario, crecimiento de tumor recidivante o crecimiento celular de cáncer recidivante. En ciertas realizaciones, se usa el crecimiento de tumor recidivante o crecimiento celular de cáncer recidivante para describir una afección en la que los pacientes se someten a o se tratan con una o más terapias disponibles en la actualidad (por ejemplo, terapias de cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia con anticuerpos anti VEGF, particularmente un régimen terapéutico convencional para el cáncer particular) que no es clínicamente adecuada para tratar a los pacientes o los pacientes ya no están recibiendo ningún efecto beneficioso de la terapia de modo que estos pacientes necesitan terapia eficaz adicional. En ciertas realizaciones, un cáncer es crecimiento de tumor recidivante o crecimiento celular de cáncer recidivante en el que el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o el tamaño tumoral no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o no consigue ninguna reducción adicional de tamaño o de número de células cancerosas. En ciertas realizaciones, los pacientes con crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante han desarrollado resistencia a una o más terapias disponibles en la actualidad. En ciertas realizaciones, el término refractario se usa para describir una afección en la que los pacientes que se someten a o se tratan con una o más terapias disponibles en la actualidad (por ejemplo, terapias de cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpos anti VEGF, particularmente un régimen terapéutico convencional para el cáncer particular) que no son clínicamente adecuadas para tratar a los pacientes. En ciertas realizaciones, los pacientes no sensibles/refractarios son pacientes que responden a terapia pero padecen efectos secundarios, no responden a la terapia o no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En ciertas realizaciones, un cáncer es un tumor no sensible/refractario en el que el tumor es intrínsecamente no sensible o resistente a tratamientos previos. En ciertas realizaciones, refractario se

refiere a una ausencia de sensibilidad intrínseca de una enfermedad o afección a una terapia que comprende un antagonista de VEGF. La determinación de si las células cancerosas son refractarias, con crecimiento de tumor recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante puede realizarse bien *in vivo* o bien *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia del tratamiento en células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "recaída" o "refractario" o "no sensible" en dicho contexto.

La invención proporciona métodos para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante en un sujeto administrando una cantidad eficaz de anticuerpo anti Bv8 para bloquear o reducir el crecimiento de tumor recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante en el sujeto. La invención proporciona métodos para tratar pacientes refractarios a una terapia que comprende un antagonista de VEGF administrando una cantidad eficaz de anticuerpo anti Bv8 al paciente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 puede administrarse después del otro producto terapéutico de cáncer. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 se administra simultáneamente con terapia de cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, la terapia de anticuerpo anti Bv8 alterna con otra terapia de cáncer, que puede realizarse en cualquier orden. La invención también abarca métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para evitar la aparición o reaparición de cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. En general, el sujeto se ha sometido o se está sometiendo actualmente a terapia de cáncer. En una realización, la terapia de cáncer es tratamiento con un agente antiangiogénico, por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente antiangiogénico incluye los conocidos en la técnica y los hallados bajo las Definiciones del presente documento. En una realización, el agente antiangiogénico es un anticuerpo o fragmento neutralizante anti VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; documentos WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; solicitudes de patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288: 149-164 (2004); y documento WO2005012359. Pueden administrarse agentes adicionales en combinación con antagonista de VEGF y un anticuerpo anti Bv8 para tratar tumor refractario, bloquear o reducir el crecimiento de tumores recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante.

Los anticuerpos anti Bv8 de la invención (y un agente terapéutico adjunto) se administran por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, los anticuerpos anti Bv8 se administran convenientemente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tal como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede tomarse en consideración en preparación y administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención posibilitan que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se introduzca en la célula en la que se localiza la diana de unión. En una realización, un anticuerpo anti Bv8 de la invención puede expresarse intracelularmente como un intracuerpo. El término "intracuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o parte de unión a anticuerpo del mismo que se expresa de forma intracelular y que es capaz de unirse selectivamente con una molécula diana, como se describe, por ejemplo, en Marasco, *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997); Kontermann, *Methods* 34: 163-170 (2004); patentes de Estados Unidos n.º 6.004.940 y 6.329.173; publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0104402, y publicación de PCT n.º WO2003/077945. Véase también, por ejemplo, documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996, con respecto al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Puede efectuarse expresión intracelular de un intracuerpo introduciendo un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o parte de unión a antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y señales secretoras normalmente asociadas con el gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) en una célula diana. Uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una parte de un anticuerpo de la invención pueden suministrarse a una célula diana, de modo que se expresan uno o más intracuerpos que son capaces de unirse con un polipéptido diana intracelular y modular la actividad del polipéptido diana. Puede usarse cualquier método convencional para introducir ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, liposomas y transfección con vectores retrovirales, adenovirales, virales adenoasociados y vaccinia que portan el ácido nucleico de interés.

En ciertas realizaciones, puede introducirse ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de un paciente por métodos *in vivo* y *ex vivo*. En un ejemplo de suministro *in vivo*, se inyecta ácido nucleico directamente en el paciente, por ejemplo, en el sitio en el que se requiere intervención terapéutica. En un ejemplo adicional de suministro *in vivo*, se introduce ácido nucleico en una célula usando transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para transferencia mediada por lípidos del gen con DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para revisión de ciertos protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256: 808-813 (1992), y documento WO 93/25673 y las referencias citadas en los mismos. En un ejemplo de tratamiento *ex vivo*, las células de un paciente se retiran, se introduce ácido nucleico en esas células aisladas, y las células modificadas se

administran al paciente bien directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 4.892.538 y 5.283.187). Un vector habitualmente usado para suministro *ex vivo* de un ácido nucleico es un vector retroviral.

5 En otra realización, se proporcionan anticuerpos de internalización. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características que potencian el suministro de anticuerpos a células, o pueden modificarse para poseer dichas características. Se conocen en este campo técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, se sabe que la cationización de un anticuerpo facilita su captación en células (véase por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.703.019).  
10 También pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo a células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente con la proteína diana puede ser ventajoso. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conservan la capacidad para unirse con la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

15 La entrada de anticuerpos en células diana puede potenciarse por otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas de Tat de VIH o la proteína de homeodominio Antennapedia son capaces de dirigir la captación eficaz de proteínas heterólogas a través de membranas celulares. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329.

20 Cuando la diana de unión de un anticuerpo se localiza en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención posibilitan que el anticuerpo atraviese la barrera hematoencefálica. Existen varios enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre y métodos basados en receptores y canales.

25 Los métodos físicos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, evitar la barrera hematoencefálica por completo o crear aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de evitación incluyen, pero sin limitación, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, Gene Therapy 9: 398-406 (2002)), infusión intersticial/suministro potenciado por convección (véase, por ejemplo, Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)), e implante de un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aperturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos (véase, por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos n.º 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its  
35 Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización, por ejemplo, por bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416), y transfección de neuronas que atraviesan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos n.º 2003/0083299).

40 Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsular el anticuerpo en liposomas que se acoplan con fragmentos de unión a anticuerpo que se unen con receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20020025313), y recubrir el anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040131692).

45 Los métodos basados en células madre para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica implican modificar por ingeniería genética células progenitoras neurales (NPC) para expresar el anticuerpo de interés y después implantar las células madre en el cerebro del individuo para tratar. Véase Behrstock *et al.* (2005) Gene Ther. Publicación en línea avanzada de 15 Dic 2005 (que indica que las NPC modificadas por ingeniería genética para expresar el factor neurotrófico GDNF redujeron los síntomas de enfermedad de Parkinson cuando se implantaron en los cerebros de modelos de roedores y primates).

50 Los métodos basados en receptores y canales de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, uso de bloqueadores glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); activar canales de potasio (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0089473), inhibir transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0073713); recubrir anticuerpos  
55 con una transferrina y modular la actividad del o los receptores de transferrina (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.004.697).

60 Se formularían, dosificarían y administrarían anticuerpos anti Bv8 de la invención de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de

- suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. Aunque no es necesario, el anticuerpo anti Bv8 se formula opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento, o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine de forma empírica/clínica que sea apropiada.
- Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos) dependerá del tipo de enfermedad para tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o bien por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente se mantendría hasta que se produjera una supresión deseada de síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg o 25 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de mayor carga inicial, seguida de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

#### Métodos de diagnóstico y métodos de detección

- Los anticuerpos anti Bv8 de la invención son útiles en ensayos que detectan la expresión de Bv8 (tales como ensayos de diagnóstico o pronóstico) en células o tejidos específicos en los que los anticuerpos se marcan como se describe posteriormente y/o se inmovilizan en una matriz insoluble.

- En otro aspecto, la invención proporciona métodos para la detección de Bv8, comprendiendo los métodos detectar el complejo Bv8-anticuerpo anti Bv8 en la muestra. El término "detección" como se usa en el presente documento incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (medición de niveles) con o sin referencia a un control.

- En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento, en los que el anticuerpo anti Bv8 comprende un marcador detectable.

- En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti Bv8 descritos en el presente documento y Bv8. En algunas realizaciones, el complejo es *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti Bv8 se marca de forma detectable.

- Pueden usarse anticuerpos anti Bv8 (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos de Bv8 descritos en el presente documento) para la detección de Bv8 en uno cualquiera de varios métodos de ensayo de detección bien conocidos.

- Por ejemplo, una muestra biológica puede ensayarse con respecto a Bv8 obteniendo la muestra de una fuente deseada, mezclando la muestra con un anticuerpo anti Bv8 para permitir que el anticuerpo forme complejo de anticuerpo/Bv8 con cualquier Bv8 presente en la mezcla, y detectando cualquier complejo de anticuerpo/Bv8 presente en la mezcla. La muestra biológica puede prepararse para ensayo por métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra particular. Los métodos de mezcla de la muestra con anticuerpos y los métodos de detección de complejo de anticuerpo/Bv8 se seleccionan de acuerdo con el tipo de ensayo usado. Dichos ensayos incluyen inmunohistoquímica, ensayos competitivos y de tipo sándwich y ensayos de inhibición estérica. Para preparación de muestras, puede usarse una muestra tisular o celular de un mamífero (típicamente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, pero sin limitación, células cancerosas tales como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. También se puede medir Bv8 en suero. La muestra puede obtenerse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser nuevo o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. La muestra tisular puede fijarse (es decir, conservarse) por metodología convencional (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute

of Pathology," 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institutes of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto habitual en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina por el fin para el que la muestra se vaya a teñir histológicamente o analizar de otro modo. Un experto habitual en la materia también apreciará que la longitud de fijación depende del tamaño de la muestra tisular y el fijador usado. Como ejemplo, puede usarse formalina tamponada neutra, Bouin o paraformaldehído, para fijar una muestra. En general, la muestra se fija en primer lugar y después se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, infiltrados e incluidos con parafina u otro medio de seccionamiento de modo que la muestra tisular pueda seccionarse. Como alternativa, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. Como ejemplo, la muestra tisular puede incluirse y procesarse en parafina por metodología convencional (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", mencionado anteriormente). Los ejemplos de parafina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez que la muestra tisular se ha incluido, la muestra puede seccionarse por un microtomo o similares (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", mencionado anteriormente). Como ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden variar de aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de grosor. Una vez seccionadas, las secciones pueden unirse a portaobjetos por varios métodos convencionales. Los ejemplos de adhesivos de portaobjetos incluyen, pero sin limitación, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. Como ejemplo, las secciones incluidas en parafina pueden unirse con portaobjetos de carga positiva y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Si se ha usado parafina como el material de inclusión, las secciones tisulares en general se desparafinizan y se rehidran con agua. Las secciones tisulares pueden desparafinizarse por varias metodologías convencionales normales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", mencionado anteriormente). Como alternativa, pueden usarse agentes no orgánicos desparafinizantes disponibles en el mercado tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

Todos los métodos analíticos de Bv8 usan uno o más de los siguientes reactivos: análogo de Bv8 marcado, análogo de Bv8 inmovilizado, anticuerpo anti Bv8 marcado, anticuerpo anti Bv8 inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos marcados también se conocen como "indicadores".

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de Bv8 y anticuerpo anti Bv8. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayo, incluyendo los ejemplos restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que deben hacerse reaccionar o derivatizarse para detectar.

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de Bv8 y anticuerpo anti Bv8. Se conocen numerosos marcadores para uso en inmunoensayo, incluyendo los ejemplos restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que deben hacerse reaccionar o derivatizarse para detectarse. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelados 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.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano rústicano (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidadas de sacáridos, 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 de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Están disponibles métodos convencionales para unir estos marcadores covalentemente con proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, pueden usarse agentes de acoplamiento tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidias, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada, y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos anteriormente descritos. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry* 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Method*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferidos del presente documento son enzimas tales como peroxidasa de rábano rústicano y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento manipulativo convencional para un experto habitual en las técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 1981), pp. 147-166.

Se requiere inmovilización de reactivos para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti Bv8 de cualquier Bv8 que permanezca libre en solución. Esto se consigue convencionalmente bien insolubilizando el anticuerpo anti Bv8 o análogo de Bv8 antes del procedimiento de ensayo, o mediante adsorción a una matriz insoluble en agua o superficie (Bennich *et al.*, documento U.S. 3.720.760), mediante acoplamiento

covalente (por ejemplo, usando reticulación de glutaraldehído) o mediante insolubilización del anticuerpo anti Bv8 o análogo de Bv8 posterior, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

5 La expresión de proteínas en una muestra puede examinarse usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha mostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares es un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para explorar y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para preparación de muestras, puede usarse una muestra tisular o celular de un mamífero (típicamente un paciente humano). La muestra puede obtenerse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser nuevo o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. La muestra tisular puede fijarse (es decir, conservarse) por metodología convencional. Un experto habitual en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina por el fin para el que se vaya a teñir histológicamente la muestra o analizar de otro modo. Un experto habitual en la materia también apreciará que la longitud de fijación depende del tamaño de la muestra tisular y el fijador usado.

15 Puede realizarse IHC en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación *in-situ* de fluorescencia. Están disponibles dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión de anticuerpo con el antígeno diana (por ejemplo, Bv8) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como un marcador fluorescente o un anticuerpo primario marcado enzimáticamente, que puede visualizarse sin interacción de anticuerpos adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une con el antígeno y después se une un anticuerpo secundario marcado con el anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar visualización del antígeno. Se produce amplificación de señal porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

20 El anticuerpo primario y/o secundario usado para inmunohistoquímica típicamente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores.

30 Aparte de los procedimientos de preparación de muestras analizados anteriormente, puede desearse tratamiento adicional de la sección tisular antes de, durante o después de IHC, por ejemplo, pueden llevarse a cabo métodos de recuperación de epítomos, tales como calentamiento de la muestra tisular en tampón de citrato (véase, por ejemplo, Leong *et al.* Appl. Immunohistochem. 4 (3): 201 (1996)).

35 Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección tisular se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de modo que el anticuerpo primario se una con el antígeno de proteína diana en la muestra tisular. Las condiciones apropiadas para conseguir esto pueden determinarse por experimentación rutinaria. El alcance de la unión de anticuerpo con la muestra se determina usando uno cualquiera de los marcadores detectables analizados anteriormente. Preferentemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como cromógeno de 3,3'-diaminobenzidina. Preferentemente el marcador enzimático se conjuga con anticuerpo que se une específicamente con el anticuerpo primario (por ejemplo el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo anti conejo de cabra).

40 La muestra de ensayo preparada de este modo puede montarse y cubrirse con un cubreobjetos. Después se determina la evaluación de portaobjetos, por ejemplo usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, habitualmente usados en la técnica.

45 Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o de tipo sándwich, están bien establecidos y se usan ampliamente en la industria de diagnóstico comercial.

50 Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de Bv8 indicador para competir con el Bv8 de la muestra de ensayo por un número limitado de sitios de unión a antígeno de anticuerpo anti Bv8. El anticuerpo anti Bv8 generalmente se insolubiliza antes o después de la competición y después el indicador y Bv8 unido al anticuerpo anti Bv8 se separan del indicador no unido y Bv8. Esta separación se consigue decantando (cuando el compañero de unión está preinsolubilizado) o por centrifugación (cuando el compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de Bv8 de muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de indicador unido como se mide por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan curvas de respuesta a dosis con cantidades conocidas de Bv8 y se comparan con los resultados de ensayo para determinar cuantitativamente la cantidad de Bv8 presente en la muestra de ensayo. Estos ensayos se denominan sistemas de ELISA cuando se usan enzimas como los marcadores detectables.

55 Otra especie de ensayo competitivo, denominado un ensayo "homogéneo", no requiere una separación de fases. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el Bv8 y se usa de modo que cuando el anticuerpo anti Bv8 se una con el Bv8 la presencia del anticuerpo anti Bv8 modifica la actividad enzimática. En este caso, el Bv8 o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un enlace orgánico bifuncional con una enzima tal como

peroxidasa. Se seleccionan conjugados para uso con anticuerpo anti Bv8 de modo que la unión del anticuerpo anti Bv8 inhiba o potencie la actividad enzimática del marcador. Este método en sí mismo se practica ampliamente bajo el nombre de EMIT.

5 Se usan conjugados estéricos en métodos de impedimento estérico para ensayo homogéneo. Estos conjugados se sintetizan uniendo covalentemente un hapteno de bajo peso molecular con un fragmento de Bv8 pequeño de modo que el anticuerpo para hapteno sea sustancialmente incapaz de unirse con el conjugado al mismo tiempo que el anticuerpo anti Bv8. Bajo este procedimiento de ensayo el Bv8 presente en la muestra de ensayo se unirá con anticuerpo anti Bv8, permitiendo de este modo que el antihapteno se una con el conjugado, dando como resultado un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

15 Los ensayos de tipo sándwich son particularmente útiles para la determinación de Bv8 o anticuerpo anti Bv8. En ensayos de tipo sándwich secuenciales se usa un anticuerpo anti Bv8 inmovilizado para adsorber Bv8 de muestra de ensayo, la muestra de ensayo se retira como por lavado, el Bv8 unido se usa para adsorber un segundo anticuerpo anti Bv8 marcado y el material unido se separa después del indicador residual. La cantidad de indicador unido es directamente proporcional al Bv8 de muestra de ensayo. En ensayos de tipo sándwich "simultáneos" la muestra de ensayo no se separa antes de añadir el anticuerpo anti Bv8 marcado. Un ensayo de tipo sándwich secuencial que usa un anticuerpo monoclonal anti Bv8 como un anticuerpo y un anticuerpo anti Bv8 policlonal como el otro es útil en ensayos de muestras con respecto a Bv8.

20 Los anteriores son ensayos de detección meramente ejemplares para Bv8. Se incluyen otros métodos desarrollados ahora o en lo sucesivo que usan anticuerpo anti Bv8 para la determinación de Bv8 dentro del alcance de la presente, incluyendo los bioensayos descritos en el presente documento.

25 En un aspecto, la invención proporciona métodos para detectar (por ejemplo, presencia o ausencia de o cantidad) un polinucleótido o polinucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de Bv8) en una muestra biológica de un individuo, tal como un sujeto humano. Pueden emplearse una diversidad de métodos para detectar polinucleótidos e incluyen, por ejemplo, RT-PCR, taqman, métodos de amplificación, micromatrices de polinucleótidos y similares.

30 Se conocen bien métodos para la detección de polinucleótidos (tales como ARNm) e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de Bv8 marcadas). Transferencia de Northern y técnicas relacionadas, y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para Bv8 y otros métodos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SPIA, Ribo-SPIA, SISBA, TMA y similares.)

35 Las muestras biológicas de mamíferos pueden ensayarse convenientemente, por ejemplo, con respecto a ARNm de Bv8 usando transferencia de Northern, transferencia puntual o análisis de PCR. Por ejemplo, se conocen bien en la técnica ensayos de RT-PCR tales como ensayos de PCR cuantitativa. En una realización ilustrativa de la invención, un método para detectar ARNm de Bv8 en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando un polinucleótido de Bv8 como cebadores con sentido y antisentido para amplificar ADNc de Bv8 en el mismo; y detectar la presencia o ausencia del ADNc de Bv8 amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar la cantidad (niveles) de ARNm de Bv8 en una muestra biológica (por ejemplo examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativa de un gen constitutivo tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del ADNc de Bv8 amplificado.

40 Pueden marcarse sondas y/o cebadores con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de Bv8 en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa proteínas Bv8. Como se entenderá por el experto en la materia, puede prepararse una gran cantidad de cebadores y sondas diferentes (por ejemplo, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento) y usarse eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia o ausencia de y/o cantidad de ARNm de Bv8.

45 Los métodos opcionales de la invención incluyen protocolos que comprenden la detección de polinucleótidos, tales como polinucleótido de Bv8, en una muestra tisular o celular usando tecnologías de micromatrices. Por ejemplo, usando micromatrices de ácido nucleico, se transcriben de forma inversa muestras de ARNm de ensayo y de control de muestras tisulares de ensayo y de control y se marcan para generar sondas de ADNc. Las sondas se hibridan después con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz se configura de modo que la secuencia y posición de cada miembro en la matriz se conozca. Por ejemplo, puede disponerse una selección de genes que tienen potencial para expresarse en ciertas patologías en un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido enfermo puede proporcionar información valiosa. La tecnología de

micromatrices utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología informática para evaluar el perfil de expresión de ARNm de miles de genes dentro de un único experimento (véase, por ejemplo, documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (Véase, por ejemplo, documento U.S. 5.700.637, patente de Estados Unidos 5.445.934 y patente de Estados Unidos 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14: 1675-1680 (1996); Cheung, V.G. *et al.*, Nature Genetics 21(Supl): 15-19 (1999) para un análisis de fabricación de matrices). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos génicos que se sintetizan directamente en o se aplican puntualmente en vidrio u otros sustratos. Habitualmente están representados miles de genes en una única matriz. Un experimento de micromatrices típico implica las siguientes etapas: 1. preparación de diana marcada con fluorescencia de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3. lavado, tinción y exploración de la matriz, 4. análisis de la imagen explorada y 5. generación de perfiles de expresión génica. Actualmente se están usando dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (habitualmente de 25 a 70 unidades) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. Al formar una matriz, los oligonucleótidos pueden prefabricarse y aplicarse puntualmente a la superficie o sintetizarse directamente sobre la superficie (*in situ*).

El sistema de Affymetrix GeneChip® es un sistema de micromatriz disponible en el mercado que comprende matrices fabricadas por síntesis directa de oligonucleótidos en una superficie de vidrio. Matrices de sonda/genes: se sintetizan directamente oligonucleótidos, habitualmente de 25 unidades, en una oblea de vidrio por una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías de síntesis química de fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligos diferentes y cada oligo está presente en millones de copias. Ya que las sondas oligonucleotídicas se sintetizan en localizaciones conocidas en la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse con respecto a identidad génica y niveles de expresión relativos por el software de Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está representado en la matriz por una serie de sondas oligonucleotídicas diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido perfectamente coincidente y un oligonucleótido desapareado. La sonda perfectamente coincidente tiene una secuencia exactamente complementaria del gen particular y por lo tanto mide la expresión del gen. La sonda desapareada difiere de la sonda perfectamente coincidente por una sustitución de una única base en la posición de base central, perturbando la unión de transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no específica que contribuye a la señal medida para el oligo perfectamente coincidente. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas desapareadas de las de las sondas perfectamente coincidentes para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Se eligen sondas basándose en la información actual de GenBank® y otros depósitos de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un horno de hibridación GeneChip® (horno "asador") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación de fluidos realiza lavado y tinción de las matrices de sondas. Es completamente automático y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo está controlado independientemente a través del software de Microarray Suite usando protocolos de fluidos preprogramados. Es explorador es un explorador de fluorescencia de láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. La estación de trabajo informática con software de Microarray Suite controla la estación de fluidos y el explorador. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones de fluidos usando protocolos preprogramados de hibridación, lavado y tinción para la matriz de sondas. El software también adquiere y convierte datos de intensidad de hibridación en una decisión de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos por análisis de comparación y formatea el resultado en archivos .txt, que pueden usarse con otros programas informáticos para análisis de datos adicionales.

En algunas realizaciones, el tratamiento es para un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de la hipófisis, cáncer pancreático, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejido blando, cáncer de mama, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), carcinomas epiteliales, cáncer de cerebro, cáncer endometrial, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de la vesícula biliar y carcinoma hepatocelular.

Se describen en el presente documento muestras biológicas, por ejemplo, en la definición de muestra biológica.

#### Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí sola o cuando se combina con otra composición u otras composiciones eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección elegida, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer

recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las primera y segunda composiciones de anticuerpos pueden usarse para tratar una afección particular, por ejemplo cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

### Ejemplos

Se usaron reactivos disponibles en el mercado referidos en los ejemplos según las instrucciones del fabricante a no ser que se indique de otro modo.

Ejemplo 1: generación de anticuerpos anti Bv8

Este ejemplo demuestra la humanización de los anticuerpos anti Bv8 murinos dirigidos contra Bv8. Los números de restos son de acuerdo con Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se usan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra.

Generación de anticuerpos anti Bv8 derivados de hibridoma

Se generaron anticuerpos anti Bv8 inmunizando ratón o hámster con polipéptidos de dominio extracelular Bv8 humanos recombinantes (PeproTech, Rock Hill, NJ). Se seleccionaron clones 2G9, 2B9, 3F1, derivados de hibridoma de ratón, que comprendían las secuencias ligera variable (VL) y pesada variable (VH) expuestas en las Figuras 2A, 2B, 3A, 3B, 4A y 4B. También se seleccionó el clon 2D3, derivado de hibridoma de hámster, que comprende las secuencias VH y VL expuestas en las Figuras 5A y 5B.

Clonación de dominios variables de anticuerpos anti Bv8 derivados de hibridoma y generación de anticuerpos quiméricos

Se extrajo ARN total de células de hibridoma que producían el anticuerpo monoclonal anti Bv8 de ratón 2B9, 3F1 y 2G9, así como anticuerpo monoclonal anti Bv8 de hámster 2D3, respectivamente, usando el minikit RNeasy (Catálogo 74104; QIAGEN; Valencia, CA). Los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH) se amplificaron usando RT-PCR con los siguientes cebadores degradados:

directo de cadena ligera (LC) de 2B9:

5'GTCAGATATCGTKCTSACMCARTCTCCAGCAATMA3' (SEQ ID NO: 225)

directo de cadena pesada (HC) de 2B9:

'GATCGACGTACGCTCAGGTGACKCTGAARGAGTCWGG3' (SEQ ID NO: 226)

directo de cadena ligera (LC) de 3F1:

5'GTACGATATCGTKCTSACCCARTCTCC3' (SEQ ID NO: 227)

directo de cadena pesada (HC) de 3F1:

5'GATCGACGTACGCTCAGGTGACKCTGAARGAGTCWGG3' (SEQ ID NO: 228)

directo de cadena ligera (LC) de 2G9:

5' GTACGATATCGTKCTSACCCARTCTCC 3' (SEQ ID NO: 229)

directo de cadena pesada (HC) de 2G9:

'GATCGACGTACGCTGAGGTYCAGCTSCAGCAGTCTGG3' (SEQ ID NO: 230)

directo de cadena ligera (LC) de 2D3:

5' GATCGATATCCARATGACNCARACNCC 3' (SEQ ID NO: 231)

directo de cadena pesada (HC) de 2D3:

5 5' GATCGA CGTACGCTGARGTGCARYTGGTGGARTCTGG3' (SEQ ID NO: 232)  
 Inverso de cadena ligera: 5'GCTGTAGGTGCTGTCTTTGCT3' (SEQ ID NO: 233)  
 Inverso de cadena pesada: 5'CTGGWCAGGGMTCCAGAGTTCCA3' (SEQ ID NO: 234)

Las secuencias de cebadores como se muestran de acuerdo con el siguiente código IUB:

10 Códigos IUB

15 G Guanina  
 A Adenina  
 T Timina  
 C Citosina  
 R (A o G)  
 Y (C o T)  
 M (A o C)  
 20 K (G o T)  
 S (C o G)  
 W (A o T)  
 H (A o C o T)  
 B (C o G o T)  
 25 V (A o C o G)  
 D (A o G o T)  
 N (A o C o G o T)

30 Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos N terminal de la región VL y VH. Respectivamente, los cebadores inversos de la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) se diseñaron para hibridar con una región en el dominio ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1), que está altamente conservado entre especies.

35 Posteriormente se ligaron productos de PCR amplificados a un vector de clonación de TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenciaron. La secuencia de ADN de VL identificada se subclonó después en el vector de expresión de células de mamífero pRK (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289 (1992)) que contiene el dominio constante kappa humano. La secuencia de ADN de VH se insertó en vectores de pRK que codifican los dominios constantes  $\gamma$ 1 humanos de longitud completa.

40 Los vectores de expresión LC y HC se cotransfectaron en la línea celular de riñón embrionario humano transformada con adenovirus 293 usando reactivos de transfección Fugene (Roche, Mannheim, Alemania). Se produjo anticuerpo en medio sin suero y se purificó por cromatografía de proteína A.

45 *Injertos de región hipervariable directos en el marco conservado consenso humano aceptor*

El fagémido usado para este trabajo es un vector de presentación de Fab-g3 monovalente y consiste en 2 fases abiertas de lectura bajo el control de un único promotor de phoA. La primera fase abierta de lectura consiste en la secuencia señal de stII fusionada con los dominios VL y CL de la cadena ligera aceptor y la segunda consiste en la secuencia señal de stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada aceptor seguido de la proteína de cubierta de fago menor P3.

Antes de generar variantes de injertos de CDR de anticuerpos anti Bv8, los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH) de anticuerpos de ratón se alinearon por secuencias con secuencias de consenso humanas.

55 Para los clones 2B9 y 3F1, la cadena ligera de consenso humana kappa 1 (huKI) y la cadena pesada de consenso humana del subgrupo III (huGIII) fueron los marcos conservados humanos más cercanos, y las regiones hipervariables de secuencias de cadena ligera y cadena pesada de 2B9 de ratón (m2B9) y 3F1 de ratón (m3F1) se injertaron en marcos conservados aceptores consenso de huKI y huGIII, respectivamente, para generar variantes de injerto de CDR directas denominadas h2B9.v1 (Figuras 6A y 6B) y h3F1.v1 (Figuras 4A y 4B).

60 Resulta interesante que, para el clon 2G9, los marcos conservados humanos más cercanos para el 2G9 de ratón fueron cadena ligera consenso humana kappa IV (huKIV) y cadena pesada consenso humana de subgrupo I (huGI). Por lo tanto, inicialmente, las regiones hipervariables cadena ligera y cadena pesada de 2G9 de ratón (m2G9) se injertaron no solamente en huKI y huGIII, sino también marcos conservados aceptores consenso de huKIV y huGI, respectivamente, para generar cuatro variantes de injertos de CDR diferentes identificadas como h2G9.K1G1, h2G9.K1G3, h2G9.K4G1 y G9.K4G3 (Figuras 14 y 15). La secuencia de marco conservado consenso de VL kappa

humano de subgrupo IV sin secuencias de HVR de cadena ligera de Kabat se muestra en SEQ ID NO: 240. La secuencia de marco conservado consenso de VH humano de subgrupo I sin secuencias de HVR de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 241. Véase Figura 1G. En el dominio VL las siguientes regiones se injertaron en el aceptor consenso humano: posiciones 24-34 en L1, 50-56 en L2 y 89-97 en L3. En el dominio VH, se injertaron las

Se generaron variantes de injerto de CDR directo (h2B9.v1, h3F1.v1, h2G9.K1G1, h2G9.K1G3, h2G9.K4G1, h2G9.K4G3) por mutagénesis de Kunkel tanto como un Fab presentado en fagos como un IgG usando oligonucleótidos separados para cada región hipervariable. Los clones correctos se identificaron por secuenciación de ADN.

#### *Selección y pulido de 2G9.K4G1*

Se midieron afinidades de unión de las cuatro variantes de anticuerpos anti Bv8 con injerto de CDR, h2G9.K1G1, h2G9.K1G3, h2G9.K4G1 y h2G9.K4G3, mediante Biacore usando un instrumento Biacore™-3000 como se describe en el presente documento. Además, se realizó ensayo de proliferación de células endoteliales corticales adrenales (ACE), como se describe en el presente documento, para investigar la actividad neutralizante de Bv8 de las cuatro variantes.

Los resultados del análisis de Biacore mostraron que las variantes h2G9.K1G1 y h2G9.K1G3 tenían velocidad de disociación significativamente rápida en análisis de alta concentración en comparación con h2G9.K4G1 y h2G9.K4G3. Además, el ensayo de proliferación de ACE mostró que entre las cuatro variantes, la variante h2G9.K4G1 tenía la mejor actividad ya que bloqueó casi completamente la unión de Bv8 con células ACE. Sin embargo, el análisis de Biacore y el ensayo de proliferación de ACE indicaron que la afinidad de unión y actividad de neutralización de anticuerpo anti Bv8 h2G9.K4G1 aún era menor que las del anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico. Por lo tanto, se seleccionó el anticuerpo anti Bv8 h2G9.K4G1 para maduración de afinidad para mejorar adicionalmente su afinidad de unión.

Antes de iniciar la maduración de afinidad de anticuerpo anti Bv8 h2G9.K4G1, las secuencias de HVR se analizaron con respecto a problemas de estabilidad potenciales que implicaban isomerización, cisteína desapareada y desamidación durante el proceso de fabricación. Se identificaron problemas potenciales en los siguientes sitios: (i) los restos adyacentes en las posiciones 28 y 29 de la secuencia variable de cadena ligera; (ii) posición 52a de la secuencia variable de cadena pesada; (iii) posición 54 de la secuencia variable de cadena pesada; y (iv) los restos adyacentes en las posiciones 95 y 96 de la secuencia variable de cadena pesada.

Se generaron variantes del anticuerpo anti Bv8 h2G9.K4G1 con sustitución de un único aminoácido en las posiciones de restos mencionadas anteriormente y cada variante se presentó como un Fab en el fago. Se generó un total de 12 variantes con la siguiente modificación de aminoácido individual, y sus afinidades de unión se evaluaron por el ELISA de competición de fago: CDR-L1 - D28E, D28S, G29A, G29S; CDR-H2 - C52aA, C52aS, N54A, N54S; CDR-H3: D95E, D95S, G96A, G96S. Las afinidades de unión de las 12 variantes en comparación con h2G9.K4G1 se muestran en la Figuras 14A y 14B. Las Figuras muestran que la mayoría de las variantes conservaron afinidad de unión ligeramente mejorada o similar. Sorprendentemente, la variante con sustitución D95S en CDR-H3 perdió completamente la unión a 1 µM de Bv8 humano. Además, la variante con sustitución D95E en CDR-H3 mostró una reducción de la afinidad de unión significativa en 100 veces en comparación con h2G9.K4G1.

Se generó un clon identificado como h2G9.K4G1.Polish combinando las siguientes cuatro sustituciones de aminoácidos: CDR-L1 - D28S; CDR-H2 - C52aS, N54S; CDR-H3: G96S. El análisis de Biacore mostró afinidades de unión similares para Fab 2G9 quimérico y Fab h2G9.K4G1.Polish, y tanto IgG 2G9 quimérico como IgG h2G9.K4G1.Polish mostraron bloqueo completo de la proliferación de células ACE inducida por Bv8 (Figura 21). Además, las sustituciones de aminoácidos en CDR- L1 - D28S; CDR-H2 - C52aS, N54S; CDR-H3: G96S (anticuerpo anti Bv8 h2G9.K4G1.Polish) restauraron inesperadamente la afinidad de unión cercana a la del anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico.

#### *Selección aleatoria blanda de las regiones hipervariables*

La diversidad de secuencia se introdujo en cada región hipervariable para mejorar adicionalmente la afinidad por el clon h2G9.K4G1.Polish usando una estrategia de selección aleatoria suave que mantiene un desvío hacia la secuencia de región hipervariable murina. Esto se consiguió usando una estrategia de síntesis de oligonucleótidos envenenada descrita por primera vez en Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37: 1233-1251 (1994). Para una posición dada dentro de una región hipervariable para mutar, el codón que codifica el aminoácido de tipo silvestre se envenena con una mezcla 70-10-10-10 de nucleótidos que da como resultado un promedio de tasa de mutación del 50 por ciento en cada posición. Los oligonucleótidos de selección aleatoria suave se modelaron según las secuencias de región hipervariable murina y abarcaron las mismas regiones definidas por los injertos de región hipervariable directos.

*Generación de bibliotecas de fagos*

Se fosforilaron grupos de oligonucleótidos aleatorios diseñados para cada región hipervariable por separado en seis reacciones de 20 µl que contenían 660 ng de oligonucleótido, Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, DTT 20 mM y polinucleótido quinasa 5 U durante 1 h a 37 °C. Los seis grupos de oligonucleótidos fosforilados se combinaron después con 20 µg de molde de Kunkel en Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM en un volumen final de 500 µl que da como resultado una relación de oligonucleótido con respecto a molde de 3. La mezcla se hibridó a 90 °C durante 4 min, 50 °C durante 5 min y después se enfrió en hielo. Se retiró el oligonucleótido no hibridado, en exceso, con un kit de purificación de PCR QIAquick (catálogo 28106, QIAGEN Inc., Valencia, CA) usando un protocolo modificado para evitar la desnaturalización excesiva del ADN hibridado. A los 500 µl de mezcla hibridada, se añadieron 150 µl de PB, y la mezcla se dividió entre 2 columnas de sílice. Después de un lavado de cada columna con 750 µl de PE y una centrifugación extra para secar las columnas, cada columna se eluyó con 110 µl de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. El molde hibridado y limpio (220 µl) se cargó después añadiendo 1 µl de ATP 100 mM, 10 µl de dNTP 25 mM (25 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 µl de DTT 100 mM, 25 µl de tampón TM 10X (Tris 0,5 M pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,1 M), 2400 U de T4 ligasa, y 30 U de T7 polimerasa durante 3 h a temperatura ambiente.

El producto cargado se analizó en geles de agarosa/Tris-acetato-EDTA (Sidhu *et al.*, Methods in Enzymology 328: 333-363 (2000)). Habitualmente son visibles tres bandas: la banda inferior es producto ligado y cargado correctamente, la banda media es cargado pero no ligado y la banda superior es cadena desplazada. La banda superior se produce por una actividad lateral intrínseca de la T7 polimerasa y es difícil de evitar (Lechner *et al.*, J. Biol. Chem. 258: 11174-11184 (1983)); sin embargo, esta banda se transforma 30 veces menos eficazmente que la banda superior y habitualmente contribuye poco a la biblioteca. La banda media se debe a la ausencia de un fosfato 5' para la reacción de ligamiento final; esta banda se transforma eficazmente y desafortunadamente proporciona principalmente secuencia de tipo silvestre.

El producto cargado se limpió después y se introdujo por electroporación en células SS320 y se propagó en presencia de fago auxiliar M13/K07 como se describe en Sidhu *et al.*, Methods in Enzymology 328: 333-363 (2000). Los tamaños de las bibliotecas variaron de 1 a 2 x 10<sup>9</sup> clones independientes. Se secuenciaron clones aleatorios de las bibliotecas iniciales para evaluar la calidad de las bibliotecas.

*Selección de fagos*

El Bv8 humano (PeproTech) se usó como la diana para la selección de fago. Bv8 humano se usó para recubrir placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) a 10 µg/ml en PBS durante el 1<sup>er</sup> ciclo de selección. Para el primer ciclo de selección, se usaron 8 pocillos de diana; se usó un único pocillo de diana para ciclos sucesivos de selección. Los pocillos se bloquearon durante 1 h usando Super Blocker (Pierce). Se recogieron fagos del sobrenadante de cultivo y se suspendieron en PBS que contenía BSA 1 % y Tween 20 0,05 % (PBST). Después de unión a los pocillos durante 2 h, se retiraron los fagos no unidos por lavado extensivo con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (PBT). Los fagos unidos se eluyeron incubando los pocillos con HCl 50 mM, KCl 0,5 M durante 30 min. Los fagos se propagaron y amplificaron usando células CL1 blue (Stratagene) y fago auxiliar M13/K07 (New England BioLabs) y se cultivaron durante una noche a 37 °C en 2YT, carbenicilina 50 µg/ml para el siguiente ciclo de selección. Los títulos de fagos eluidos de un pocillo recubierto con diana se compararon con títulos de fagos recuperados de un pocillo no recubierto con diana para evaluar el enriquecimiento.

Comenzando en el 2<sup>o</sup> ciclo de selección, las bibliotecas de fagos se clasificaron usando un método de clasificación en solución (Lee, C.V., *et al.* (2004) J. Mol. Biol 340 (5): 1073-93), el cual permite aumentar la rigurosidad de la selección para aislar clones con afinidad mejorada. Bv8 humano se biotiniló usando sulfo-NHS-LC-biotina (b-Bv8, Pierce, Rockford, IL). Se recubrieron pocillos de microtitulación con neutravidina 10 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C y después se bloquearon durante 1 h usando Super Blocker (Pierce). Para el segundo ciclo de selección, se mezclaron 200 µl de fago suspendido en tampón de PBST con b-Bv8 5 nM durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Se capturaron fagos unidos a b-Bv8 en pocillos recubiertos con neutravidina durante 15 min a TA y se retiraron por lavado fagos no unidos con tampón de PBT. Los fagos se eluyeron usando HCl 100 mM durante 30 m, se neutralizaron y se propagaron como se ha descrito anteriormente. Los siguientes ciclos de selección se realizaron de forma similar a la selección del ciclo 2 con las siguientes excepciones: en el ciclo 3 y 4, la concentración de b-Bv8 final fue de 0,1 nM, en los ciclos 5 la concentración de b-Bv8 final fue de 0,05 nM. Comenzando en el ciclo 4 y 5, después de la unión de fago con b-Bv8, se añadieron exceso de 500 y 1000 veces de Bv8 humano no biotinilado a la mezcla respectivamente durante 1-2 horas a TA para superar por competición los agentes de unión de velocidad de disociación rápida antes de la captura en neutravidina.

*ELISA de competición de fagos para determinar la CI50 del fago*

Se recubrieron placas de micro titulación MAXISORP™ con Bv8 humano recombinante (PeproTech) a 2 µg/ml en PBS durante una noche y después se bloquearon con tampón de PBST (BSA 0.5 % y Tween 20 0,05 % en PBS) durante una hora a temperatura ambiente (TA). Se incubaron fagos de sobrenadantes de cultivo con Bv8 humano diluido en serie en tampón de PBST en una placa de microtitulación de cultivo tisular durante una hora a TA,

después de lo cual se transfirieron 80 µl de la mezcla a los pocillos recubiertos con diana durante 15 minutos para capturar fago no unido. La placa se lavó con tampón de PBT (Tween 20 0,05 % en PBS), y se añadió anti M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 en tampón de PBST) durante 40 minutos. La placa se lavó con tampón de PBT y se desarrolló añadiendo sustrato de tetrametilbenzidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se representó la absorbancia a 450 nm en función de la concentración de diana en solución para determinar la  $CI_{50}$  del fago. Esto se usó como una estimación de la afinidad por el clon de Fab presentado en la superficie del fago. Las Figuras 14A y 14B representan los resultados de un ensayo de competición de fagos que demuestran la unión de variantes de h2G9.K4G1 pulidas (L1: D28E, D28S, G29A, G29S, H2: C52aA, C52aS, N54A, N54S, H3: D95E, D95S, G96A y G96S) frente a Bv8 humano. Las Figuras 16 y 17 representan resultados de un ensayo de competición de fagos que demuestran la unión de variantes de h2G9.K4G1.Polish con afinidad mejorada (h2G9.K4G1.v27, v52, v55, v63, v64, v67, v77, v80 de biblioteca con selección aleatoria suave L1/L2; h2G9.K4G1.v19, v25, v37, v65, v73, v75, v77. v92 de biblioteca con selección aleatoria suave H1/H2) frente a Bv8 humano.

#### 15 *Determinaciones de la afinidad de anticuerpos por BIAcore*

Para determinaciones de afinidad de unión de anticuerpos anti Bv8 (Fab o IgG), se usó medición de resonancia de plasmón superficial (SRP) con un instrumento BIAcore™-3000. Se activó la microplaca biosensora CM5 con reactivos de EDC y NHS según las instrucciones del proveedor y se acopló Bv8 humano (PeproTech) o mono cinomolgus (Genentech; PUR21590) para conseguir aproximadamente 150 unidades de respuesta (UR), siguiendo después por bloqueo de grupos que no han reaccionado con etanolamina 1 M. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie dobles de FAb anti Bv8 (0,19 nM a 25 nM) o IgG (0,019 nM a 10 nM) en tampón de HBS-P (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 0,005 %) a 25 °C con un caudal de 30 µl/min. Se calcularon las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (software BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calculó como la relación  $k_{off}/k_{on}$ . Véase Figuras 18 a 21. Los resultados muestran que los anticuerpos anti Bv8 humanizados, h2G9.K4G1.v19 y h2G9.K4G1.v55, se unen con Bv8 humano y de cinomolgus de una forma al menos dos veces más estrecha que el anticuerpo anti Bv8 2G9 quimérico.

#### 30 *Ensayo de proliferación de ACE*

Se sembraron células ACE a una densidad de 5000 células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio de cultivo. Para el ensayo de inhibición, se añadieron anticuerpos anti Bv8 a concentraciones indicadas (µg/ml) en primer lugar. Después de 0,5-1 hora, se añadió después Bv8 humano (PeproTech) a una concentración final de 10 nM. Después de 6 días, las células se disociaron añadiendo 1 ml de Tripsina 2x (GIBCO) a cada pocillo, y los pocillos por duplicado se contaron usando el analizador de recuento y tamaño de partículas Z2 Coulter (Beckman Coulter). Véase Figuras 12, 13, 15, 23 y 24. La Figura 23 muestra que los anticuerpos anti Bv8 humanizados h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v52, h2G9K4G1.v55 y h2G9K4G1.v73 mostraron mejora significativa del bloqueo de proliferación de ACE inducida por Bv8 humano.

#### 40 *ELISA de competición para mapear epítomos de anticuerpos de Bv8*

Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos NUNC™ (NUNC; Roskilde, Dinamarca) con IgG 2B9 quimérico a 1 µg/ml en PBS durante una noche y después se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con tampón de PBST (BSA 0,5 % y Tween 20 0,05 % en PBS). Se preparó biotilación de Bv8 humano usando reactivo EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotina (Catálogo 21335; Pierce; Rockford, IL) en una relación molar de 1:4 (HuBv8: biotina).

Para determinar la cantidad de Bv8 humano biotilado en el ensayo de competición, se añadió Bv8 humano biotilado diluido en serie tres veces de 100 nM a 0,04 nM a las placas recubiertas con anticuerpo durante 15 minutos. Después las placas se lavaron con tampón de PBT (PBS y Tween 20 0,05 %). Se detectaron biotilados unidos usando estreptavidina, que se conjugó con peroxidasa de rábano rusticano (catálogo 21126; Pierce; Rockford, IL) y se diluyó 1:2500 en tampón de PBST. Después de 45 minutos de incubación, la placa se lavó y se añadieron 100 µl de tetrametilbenzidina (R & D Systems) a cada pocillo durante aproximadamente 5 minutos para inducir revelación de señal. Cuando apareció la coloración azul, se añadieron 100 µl de ácido fosfórico a 1 M a cada pocillo para detener el proceso de revelado. La densidad óptica se leyó espectrofotométricamente a 450 nm.

Para mapear los epítomos de anticuerpo de Bv8 con 2B9 quimérico, se incubaron en primer lugar diluciones en serie triples de IgG (2B9 quimérico, 3F1 quimérico, 2D3 quimérico, 2G9 quimérico e IgG de control) con Bv8 humano biotilado 2 nM, determinado por el ensayo de unión anterior, en tampón de PBST durante 1-2 horas a temperatura ambiente, y después se transfirieron a una placa recubierta con anticuerpo (IgG 2B9 quimérico; 1 µg/ml) durante 15 min. Después la placa se lavó con tampón de PBT y se detectó la cantidad de Bv8 humano biotilado unido a IgG 2B9 quimérico en la placa por los protocolos como se ha descrito anteriormente.

En el ensayo de competición, los anticuerpos 3F1 quimérico y 2G9 quimérico compitieron con 2B9 quimérico que se unía a Bv8 humano, lo que sugiere que ambos anticuerpos tienen epítomos solapantes con 2B9 quimérico. Sin embargo, 2D3 quimérico 2D3 solamente mostró competición parcial con unión del anticuerpo 2B9 quimérico a Bv8

humano, lo que sugiere que el anticuerpo 2D3 quimérico puede tener un epítipo o epítipos distintos de 2B9 quimérico así como anticuerpos 3F1 quimérico y 2G9 quimérico (Figura 11).

#### Ejemplo 2: estudios de eficacia *in vivo*

5 Se obtuvieron células humanas HT-55, Colo-205 (carcinoma colorrectal), A673 (rabdomyosarcoma), HPAC (carcinoma pancreático) y Calu-6 (carcinoma de pulmón) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). La línea celular HM7 de carcinoma colorrectal humano es un derivado de LS 174T. Las Calu-6, A673, HPAC y HM7 se cultivaron en F12 de Ham, DMEM 1:1 de baja glucosa. Se cultivaron Colo-205 y HT-55 en medio RPMI 10 1640. Ambos medios se complementaron con FBS 10 % v/v, penicilina/estreptomina 1 % v/v (Invitrogen, Carlsbad, CA), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA) y FUNGIZONE™ 1 µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> 5 % hasta su confluencia, se recogieron y se resuspendieron en Matrigel estéril a 15 x 10<sup>6</sup> células por ml. Se inocularon xenoinjertos en ratones desnudos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (Charles River; Hollister, CA) por inyección subcutánea en el flanco dorsal (s.c.) de 1,5 x 10<sup>6</sup> células por ratón y se permitió que crecieran. El tratamiento con anticuerpos anti Bv8, 2D3 quimérico, 3F1 quimérico, 2B9 quimérico y 2G9 quimérico; 2G9 humanizado variante 19, 2G9 humanizado variante 55 y 2G9.K4G1.Polish humanizado, i.p. a la dosis de 10 mg/kg dos veces a la semana se inició 24 h después de la inoculación de células tumorales. Como controles, se emplearon Mab anti GP-120 10 mg/kg dos veces por semana y Mab anti VEGF G6.31 o B20 5 mg/kg dos veces por semana (Liang, WC, *et al.*, J Biol Chem 281, 951-961 (2006)). En todos los experimentos, se midieron los tumores trasplantados dos veces por semana a lo largo del eje más largo y el eje perpendicular usando un calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon usando las fórmulas de volumen elipsoide (0,5 x L x A x A) y los volúmenes tumorales medios y el error típico de 10 ratones por grupo en todos los tratamientos que aparecen en las figuras. Los anticuerpos anti Bv8 también tienen un efecto aditivo en carcinoma de pulmón no microcítico humano LXFL529 cuando se usan en combinación con anticuerpo anti VEGF. Se implantaron en ratones desnudos Beige (n = 7-9) células de carcinoma de pulmón no microcítico humano LXFL529. Después los ratones se trataron con anticuerpos de control anti ambrosía y anti Bv8 de ratón (3F1 y 2B9) en un periodo de 24 horas después de la inoculación tumoral. Los ratones se trataron con anticuerpo anti VEGF después de haber alcanzado los tumores ~ 400 mm<sup>3</sup>. Los resultados muestran que el tratamiento con anticuerpo Bv8 quimérico y humanizado dieron como resultado una reducción del crecimiento tumoral en diversos tumores como un único agente y en combinación con anticuerpo anti VEGF. Véase Figuras 25 a 37.

Se obtuvieron células LLC (carcinoma de pulmón de Lewis) de ratón, H460 (carcinoma de pulmón no microcítico) humanas y HT29 (carcinoma colorrectal) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Las células LLC y HM7 se cultivaron en medio RPMI 1640 más L-glutamina 1 % con suero bovino fetal 10 % (Hyclone, Logan, UT). Las células se cultivaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> 5 %, se recogieron, se centrifugaron, se lavaron una vez con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se contaron. Las células LLC se resuspendieron en HBSS 50 % y Matrigel™ 50 % (BD Biosciences; San Jose, CA) y se resuspendieron células HM7 en HBSS (Invitrogen; Carlsbad, CA), ambas a una concentración de 3,5 x 10<sup>7</sup> células/ml para inyección en ratones. Se cultivaron células H460 en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, penicilina G 100 unidades/ml, sulfato de estreptomina 100 µg/ml, piruvato sódico 1 mM, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, bicarbonato sódico 0,075 % y gentamicina 25 µg/ml. Las células se cultivaron en matraces de cultivo tisular en un incubador humidificado a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 % y aire 95 %, después se recogieron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 5 x 10<sup>7</sup> células/ml para inyección en ratones. Se obtuvieron originalmente células HT29 de ATCC, y se mantuvieron posteriormente tumores de xenoinjertos resultantes como una línea *in vivo* por trasplante subcutáneo en serie de ratones desnudos atímicos antes de la implantación para un experimento. Se inocularon células LLC en ratones desnudos atímicos BALB/c hembra de 8 a 9 semanas de edad (Charles River, Hollister, CA) por inyección subcutánea (S.C.) del flanco dorsal con 3,5 x 10<sup>6</sup> células por ratón y se permitió que crecieran como aloinjertos. Se inocularon células HM7 en ratones desnudos atímicos hembra de 12 semanas de edad (*nu/nu*) (Harlan Sprague Dawley, Inc; Frederick, MD) por inyección S.C. en las patas traseras con 3,5 x 10<sup>6</sup> células por ratón, se inocularon células H460 en ratones desnudos atímicos hembra de 10 a 11 semanas de edad (*nu/nu*) (Harlan Sprague Dawley, Inc; Frederick, MD) por inyección S.C. en el flanco dorsal con 1 x 10<sup>7</sup> células por ratón, y se implantaron fragmentos tumorales HT29 a 1 mm<sup>3</sup> S.C. en el flanco de ratones desnudos atímicos hembra de 11 a 12 semanas de edad (*nu/nu*) (Harlan Sprague Dawley, Inc; Frederick, MD). Se dosificaron anticuerpos anti Bv8 2D3 quimérico, 3F1 murino y 2B9 murino por i.p. a 10 mg/kg dos veces por semana y anticuerpo anti Bv8 humanizado 2G9, i.p. a 30 mg/kg una vez por semana. Como controles, se administraron MAb anti ambrosía, i.p. a 30 o 100 mg/kg dos veces por semana, y MAb anti VEGF B20-4.1.1, i.p. a 5 mg/kg dos veces por semana. Los tratamientos se iniciaron en el siguiente periodo de tiempo después de la inoculación celular o la implantación tumoral (HT29): 7 h para LLC, 8 días para HM7, 11 días para H460 y 36 días para HT29. Se midieron los pesos tumorales y corporales, y se realizaron observaciones clínicas generales a un mínimo de dos veces por semana durante el transcurso del estudio. Se calcularon los volúmenes tumorales usando la fórmula de volumen elipsoide (0,5 x L x A x A). Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales a lo largo del tiempo, se usó un enfoque de modelización mixta, y se generaron datos de volúmenes de tumores ajustados (Pinheiro *et al.* nlme: linear and nonlinear mixed effects models; 2009; paquete Versión R versión 3.1-96). Se construyen representaciones de Kaplan-Meier para mostrar el porcentaje de animales que permanecen en el estudio en función del tiempo. El tratamiento con anticuerpos anti Bv8 murinos y humanizados dio como resultado una reducción del crecimiento tumoral en diversos tumores (véanse Figuras 38 a 40 y 42) y supervivencia prolongada (véase Figuras 41 y 43)

como un único agente y en combinación con anticuerpo anti VEGF.

Ejemplo 3: ELISA competitivo para medir la capacidad de anticuerpos anti Bv8 humanizados para bloquear la unión de Bv8 humano con anticuerpo 2G9 de ratón

- 5 Se recubrieron placas de 384 pocillos Maxisorp con 1 µg/ml de anticuerpo IgG1 2G9 de ratón parental a 25 µl/pocillo en tampón de carbonato sódico 50 mM, pH 9,6, a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía polisorbato 0,05 %, pH 7,4 y se bloqueó con PBS que contenía BSA 0,5 %, Proclina 10 ppm, pH 7,4, a 80 µl/pocillo. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente, las
- 10 placas se lavaron. Se añadió una mezcla de anticuerpos 2G9 humanizados diluidos en serie (0,11 pM-180 nM) en PBS que contenía BSA 0,5 %, polisorbato 20 0,05 %, pH 7,4 y Bv8 humano biotinilado (concentración final 0,5 ng/ml o 57 pM) a 25 µl/pocillo. Después de dos horas de incubación, las placas se lavaron y se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano rústicano (GE Healthcare). Después de una incubación final de 30 minutos, las
- 15 placas se lavaron y se añadió sustrato 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Para análisis de datos, las curvas de valoración se ajustaron usando un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros y se determinaron las concentraciones de CI50 (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, PA).
- 20 Los resultados muestran que los anticuerpos anti Bv8 humanizados h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 y h2G9.K4G1.v19H/v55L tienen mayor capacidad para bloquear la unión de Bv8 humano con el anticuerpo 2G9 de ratón en comparación con anticuerpos anti Bv8 2G9 quimérico y h2G9.K4G1.Polish. Véase Figura 22.
- 25 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera que son las realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no está limitada a dichas realizaciones. Por el contrario, se pretende que la invención abarque diversas modificaciones y equivalentes incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 30 A lo largo de la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones, la expresión “que comprende” se usa como una expresión de transición abierta, inclusiva, que no excluye elementos o etapas de métodos adicionales, no indicados.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> GENENTECH, INC., *et al.*
- <120> ANTICUERPOS ANTI BV8 Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> P4373R1 WO
- 40 <141> 22-12-2010
- <150> US 61/284.743
- <151> 23-12-2009
- 45 <150> US 61/414.052
- <151> 16-11- 2010
- <160> 241
- 50 <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
- <223> La secuencia está sintetizada
- 60 <400> 1

ES 2 585 350 T3

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

5 <210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La La secuencia está sintetizada

<400> 2

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

15 <210> 3  
 <211> 112  
 <212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La La secuencia está sintetizada

5

<400> 3

```

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

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           110
    
```

10

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La La secuencia está sintetizada

<400> 4

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Thr Gly
 1           5           10           15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
    
```

20

ES 2 585 350 T3

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

Ser

<210> 5  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 5

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

15

<210> 6  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>

ES 2 585 350 T3

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 6

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

5

Ser

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 7

ES 2 585 350 T3

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

<210> 8  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 8

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

Ser

15

<210> 9

ES 2 585 350 T3

<211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 9

```

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

10 <210> 10  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

20 <400> 10

ES 2 585 350 T3

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

Ser

<210> 11  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 11

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

15

<210> 12

ES 2 585 350 T3

<211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 12

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

10 **Ser**

<210> 13  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

20 <400> 13

ES 2 585 350 T3

```

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

```

5 <210> 14  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 14

```

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

```

Ser

15 <210> 15

ES 2 585 350 T3

<211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 15

```

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

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp
20 25 30

Tyr Tyr His Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110
  
```

10

<210> 16  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

20

<400> 16

ES 2 585 350 T3

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

Ser

<210> 17  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 17

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

Ile Lys Arg

<210> 18

ES 2 585 350 T3

<211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 18

```

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

10 <210> 19  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

20 <400> 19

```

    Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
     1           5           10           15
    Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe
           20           25           30
    Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Thr
           35           40           45
    
```

ES 2 585 350 T3

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 80 85 90  
 Ser Ser Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105

Lys Arg

5 <210> 20  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 10 <400> 20

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

15 <210> 21  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 21

ES 2 585 350 T3

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

Lys Arg

<210> 22  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 22

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

<210> 23  
 <211> 107  
 <212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 23

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

10

<210> 24

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 24

ES 2 585 350 T3

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

<210> 25  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 25

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

<210> 26  
 <211> 115  
 <212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 26

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

10

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 27

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

20

ES 2 585 350 T3

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

<210> 28  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 28

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

<210> 29  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

20

ES 2 585 350 T3

<400> 29

```

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

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           110

```

5

<210> 30  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 30

```

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

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
           110          115

```

ES 2 585 350 T3

5 <210> 31  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10 <400> 31

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

15 <210> 32  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 32

ES 2 585 350 T3

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

<210> 33  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 33

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

<210> 34  
 <211> 115

ES 2 585 350 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 34

```

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

10 <210> 35  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

20 <400> 35

ES 2 585 350 T3

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

Lys Arg

<210> 36  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 36

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

<210> 37  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 37

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

Lys Arg

10 <210> 38  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 38

ES 2 585 350 T3

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

<210> 39  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 39

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

15

<210> 40  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 40

```

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

10 <210> 41  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 41

```

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

ES 2 585 350 T3

5 <210> 42  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10 <400> 42

```

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

15 <210> 43  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 43

ES 2 585 350 T3

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

Lys Arg

5 <210> 44  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 44

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

15 <210> 45  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 45

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

Lys Arg

10 <210> 46  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 46

ES 2 585 350 T3

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

5 <210> 47  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 47

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

15 <210> 48  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 48

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

10 <210> 49  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 49

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10					15

20 <210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 50

30 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 5

35 <210> 51  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 585 350 T3

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 51

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His  
5 10

20

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 53

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

30

Lys Gly

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

40

<400> 54

Asp Gly Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

45

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 55

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

ES 2 585 350 T3

5  
<210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

10  
<400> 56

**Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser**  
5

15  
<210> 57  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 57

**Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr**  
5

25  
<210> 58  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 58

**Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His**  
5 10

35  
<210> 59  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

45  
<400> 59

**Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe**  
1 5 10 15

**Lys Gly**

50  
<210> 60  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

55  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

ES 2 585 350 T3

<400> 60

**Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr**  
5 10

5

<210> 61  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 61

**Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn**  
1 5 10 15

20

<210> 62  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 62

**Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser**  
5

30

<210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 63

**Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr**  
5

40

<210> 64  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

50

<400> 64

**Gly Tyr Ser Leu Thr Asn Tyr Asp Met His**  
5 10

55

<210> 65  
<211> 17  
<212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 65

**Tyr Ile His Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe**  
1 5 10 15

**Lys Gly**

10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 66

**Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr**  
5 10

20

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

30

<400> 67

**Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn**  
1 5 10 15

35

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 68

**Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser**  
5

45

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 69

55

ES 2 585 350 T3

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

5 <210> 70  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 70

Gly Tyr Ser Leu Phe His Tyr Asp Met His  
5 10

15 <210>71  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 71

Tyr Ile Ser Thr Tyr Thr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

25 Lys Gly

30 <210> 72  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 72

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

40 <210> 73  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 73

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

50 <210> 74  
<211> 7  
<212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 74

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
5

10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 75

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

20

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

30

<400> 76

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His  
5 10

35

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 77

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

45

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 78

55

ES 2 585 350 T3

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

5 <210> 79  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 79

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

15 <210> 80  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 80

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
5

25 <210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
35 <400> 81

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

40 <210> 82  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 82

Gly Tyr Ser Phe Thr His Tyr Asp Met His  
5 10

50 <210> 83  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>

ES 2 585 350 T3

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 83

Tyr Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Glu Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

5

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 84

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

<210> 85

20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 85

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Gly Ala Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

30

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 86

40

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr  
5

<210> 87

45

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 87

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

ES 2 585 350 T3

<210> 88  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 88  
 10  
                   Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His  
   5  10  
  
 <210> 89  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 20  
 <400> 89  
  
                   Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
                           1                                  5                                  10                                  15  
  
                   Lys Gly  
 25  
 <210> 90  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 90  
  
                   Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
   5  10  
 35  
  
 <210> 91  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 45  
 <400> 91  
  
                   Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Tyr Met Asn  
                           1                                  5                                  10                                  15  
 50  
 <210> 92  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

ES 2 585 350 T3

<400> 92

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser  
5

5

<210> 93  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 93

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

20

<210> 94  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 94

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His  
5 10

30

<210> 95  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 95

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

40

Lys Gly

45

<210> 96  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 96

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

ES 2 585 350 T3

<210> 97  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 97

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

<210> 98  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

20

<400> 98

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
5

25

<210> 99  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 99

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

35

<210> 100  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

45

<400> 100

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His  
5 10

50

<210> 101  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

55

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 101

ES 2 585 350 T3

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

5 <210> 102  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 102

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

15 <210> 103  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 103

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

25 <210> 104  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 104

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser  
5

40 <210> 105  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 105

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

50 <210> 106  
<211> 10  
<212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 106

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His  
5 10

10

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 107

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

20

Lys Gly

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

30

<400> 108

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

35

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 109

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

45

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

55

<400> 110

**Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser**  
5

5 <210> 111  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 111

**Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr**  
5

15 <210> 112  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 112

**Gly Tyr Thr Phe Met His Tyr Asp Met His**  
5 10

25 <210> 113  
<211> 17  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
35 <400> 113

**Tyr Ile Ser Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe**  
1 5 10 15

**Lys Gly**

40 <210> 114  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 114

**Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr**  
5 10

50 <210> 115  
<211> 15  
<212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 115

**Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Trp Val Asp Ser Tyr Met Asn**  
**1 5 10 15**

10 <210> 116  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 116

**Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr**

20 5

<210> 117  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

30 <400> 117

**Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr**  
**5**

35 <210> 118  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 118

**Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His**  
**5 10**

45 <210> 119  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

55 <400> 119

ES 2 585 350 T3

**Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe**  
1 5 10 15

**Lys Gly**

5 <210> 120  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 120

**Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr**  
5 10

15 <210> 121  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 121

**Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn**  
1 5 10 15

25 <210> 122  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 122

35

**Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser**  
5

40 <210> 123  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 123

**Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr**  
5

50 <210> 124  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 124

5 Gly Tyr Ser Phe Thr His Tyr Asp Met His  
5 10

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

15 <400> 125

Tyr Ile Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 126

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 126

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

30 <210> 127

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 127

40 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

<210> 128

45 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 128

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
5



ES 2 585 350 T3

<400> 133

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
 1 5 10 15

5 <210> 134  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 134

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr  
 5

15 <210> 135  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

25 <400> 135

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
 5

30 <210> 136  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 136

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Asp Met His  
 5 10

40 <210> 137  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 137

50 Tyr Ile Thr Thr Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 1 5 10 15

Lys Gly

ES 2 585 350 T3

5  
<210> 138  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 138  
Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

10  
  
<210> 139  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 139  
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe Ala Glu Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

15  
  
<210> 140  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 140  
Ala Ala Ser Tyr Arg Glu Ser  
5

20  
  
<210> 141  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 141  
Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

25  
  
<210> 142  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
  
<400> 142



ES 2 585 350 T3

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 147

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

10 <210> 148  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 148

Gly Tyr Ser Phe Val His Tyr Asp Met His  
5 10

20 <210> 149  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 149

30

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

35 <210> 150  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 150

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

45 <210> 151  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 151

ES 2 585 350 T3

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Tyr Met Asn  
 1 5 10 15

5 <210> 152  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 152

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser  
 5

15 <210> 153  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 153

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
 5

25 <210> 154  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 154

Gly Tyr Ser Leu Thr Asn Tyr Asp Met His  
 5 10

40 <210> 155  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 155

Tyr Ile His Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 1 5 10 15

Lys Gly

50 <210> 156  
 <211> 12  
 <212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 156

**Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr**  
5 10

10

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 157

**Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His**  
5 10

20

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

30

<400> 158

**Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**  
5

35

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 159

**Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr**  
5

45

<210> 160

<211> 12

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

55

<400> 160

ES 2 585 350 T3

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
5 10

5 <210> 161  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 161

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

Ser

15 <210> 162  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 162

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Thr Tyr  
5 10

25 <210> 163  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
35 <400> 163

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His  
5 10

40 <210> 164  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
45 <400> 164

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
5

50 <210> 165  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 165

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr  
5

10 <210> 166  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 166

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
5 10

20 <210> 167  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 167

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

30 Ser

35 <210> 168  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 168

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Thr Tyr  
5 10

45 <210> 169  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 169

ES 2 585 350 T3

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His  
5 10

5 <210> 170  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 170

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
5

15 <210> 171  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 171

Gln Gln Trp Ser Phe Asp Pro Ile Thr  
5

25 <210> 172  
<211> 12  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
35 <400> 172

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
5 10

40 <210> 173  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 173

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

Ser

50 <210> 174  
<211> 10  
<212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 174

**Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr**  
5 10

10

<210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 175

**Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His**  
5 10

20

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

30

<400> 176

**Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**  
5

35

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 177

**Gln Gln Trp Ser Trp Glu Pro Leu Thr**  
5

45

<210> 178

<211> 12

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

55

<400> 178

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
 5 10

5 <210> 179  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 179

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

Ser

15 <210> 180  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 180

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr  
 5 10

25 <210> 181  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 181

Ser Ala Ser Ser Pro Val Phe Tyr Met His  
 5 10

35 <210> 182  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 182

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 5

45 <210> 183  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55

ES 2 585 350 T3

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 183

Gln Gln Trp Ser Tyr Glu Pro Leu Thr  
5

10 <210> 184  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 184

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
5 10

20 <210> 185  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 185

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

30 Ser

<210> 186  
<211> 10  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
40 <400> 186

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr  
5 10

45 <210> 187  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 187

ES 2 585 350 T3

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His  
5 10

5  
<210> 188  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 188

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
5

15  
<210> 189  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 189

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr  
5

25  
<210> 190  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
35  
<400> 190

Gly Phe Tyr Ile Ser Thr Pro Gly Met Gly Val Ser  
5 10

40  
<210> 191  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45  
<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 191

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

50  
Ser  
<210> 192  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 192

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr  
5 10

10 <210> 193  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 193

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His  
5 10

20 <210> 194  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 194

30 <210> 194  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
5

35 <210> 195  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 195

Gln Gln Trp Ser Tyr Asp Pro Met Thr  
5

45 <210> 196  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 196

55 <210> 196  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
5 10

ES 2 585 350 T3

<210> 197  
<211> 16  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

10 <400> 197

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 198  
15 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
20 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 198

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr  
5 10

25 <210> 199  
<211> 15  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 199

35 Glu Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

<210> 200  
40 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
45 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 200

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
5

50 <210> 201  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>

ES 2 585 350 T3

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 201

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

5

<210> 202

<211> 10

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

15

<400> 202

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn  
5 10

20

<210> 203

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 203

Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Asp

30

<210> 204

<211> 12

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

40

<400> 204

Asp Ser Ser Tyr Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr  
5 10

45

<210> 205

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 205

ES 2 585 350 T3

Glu Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

5 <210> 206  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 206

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
5

15 <210> 207  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 207

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
5

25 <210> 208  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
35 <400> 208

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn  
5 10

40 <210> 209  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada  
<400> 209

Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Asp

50 <210> 210  
<211> 12  
<212> PRT

ES 2 585 350 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

5

<400> 210

**Asp Ser Ser Tyr Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr**  
5 10

10

<210> 211

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 211

**Lys Ser Ser Glu Tyr Val Ser Asn Ala Leu Ser**  
5 10

20

<210> 212

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

30

<400> 212

**Gly Thr Asn Lys Leu Glu Asp**  
5

35

<210> 213

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 213

**Gln Gln Gly Tyr Asp Ile Pro Thr**  
5

45

<210> 214

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> La secuencia está sintetizada

<400> 214

55

**Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Gly**  
5 10

ES 2 585 350 T3

<210> 215  
<211> 19  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> La secuencia está sintetizada

10 <400> 215

Gly Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly  
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

15 <210> 216  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 216

Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ser  
5 10

25 <210> 217  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> La secuencia está sintetizada

35 <400> 217

ES 2 585 350 T3

```

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

Ile Lys Arg

```

5 <210> 218  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 218

```

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

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          110

```

15 <210> 219  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 585 350 T3

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 219

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

10 <210> 220  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 220

ES 2 585 350 T3

```

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

```

5 <210> 221  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 221

```

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

```

ES 2 585 350 T3

5 <210> 222  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10 <400> 222

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

15 <210> 223  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 223

ES 2 585 350 T3

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

Ser

<210> 224  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> La secuencia está sintetizada

10

<400> 224

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

Ser

5	<p>&lt;210&gt; 225                  &lt;211&gt; 35                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; La secuencia está sintetizada</p>	
10	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 13                  &lt;223&gt; N es Guanina o Timina</p>	
15	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 16                  &lt;223&gt; N es Guanina o Citosina</p>	
20	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 19                  &lt;223&gt; N es Adenina o Citosina</p>	
25	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 22                  &lt;223&gt; N es Adenina o Guanina</p>	
30	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 34                  &lt;223&gt; N es Adenina o Citosina</p>	
35	<p>&lt;400&gt; 225                  gtcagatatt gtnctnacnc antctccagc aatna</p>	35
40	<p>&lt;210&gt; 226                  &lt;211&gt; 37                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; La secuencia está sintetizada</p>	
45	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 23                  &lt;223&gt; N es Guanina o Timina</p>	
50	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 29                  &lt;223&gt; N es Adenina o Guanina</p>	
55	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; Incierto                  &lt;222&gt; 35                  &lt;223&gt; N es Adenina o Timina</p>	
60	<p>&lt;400&gt; 226                  gatcgacgta cgctcaggtg acnctgaang agtcngg</p>	37
65	<p>&lt;210&gt; 227                  &lt;211&gt; 27</p>	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> La secuencia está sintetizada	
10	<220> <221> Incierto <222> 13 <223> N es Guanina o Timina	
15	<220> <221> Incierto <222> 16 <223> N es Guanina o Citosina	
20	<220> <221> Incierto <222> 22 <223> N es Adenina o Guanina	
25	<400> 227 gtacgatatc gtnctnacc antctcc	27
30	<210> 228 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> La secuencia está sintetizada	
40	<220> <221> Incierto <222> 23 <223> N es Guanina o Timina	
45	<220> <221> Incierto <222> 29 <223> N es Adenina o Guanina	
50	<220> <221> Incierto <222> 35 <223> N es Adenina o Timina	
55	<400> 228 gatcgacgta cgctcaggtg acnctgaang agtcngg	37
60	<210> 229 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> La secuencia está sintetizada	
70	<220> <221> Incierto <222> 13 <223> N es Guanina o Timina	
75	<220> <221> Incierto <222> 16	

	<223> N es Guanina o Citosina	
	<220>	
5	<221> Incierto	
	<222> 22	
	<223> N es Adenina o Guanina	
	<400> 229	
10	gtacgatatc gtnctnaccc antctcc	27
	<210> 230	
	<211> 37	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia está sintetizada	
	<220>	
20	<221> Incierto	
	<222> 20	
	<223> N es Citosina o Timina	
	<220>	
25	<221> Incierto	
	<222> 26	
	<223> N es Guanina o Citosina	
	<400> 230	
30	gatcgacgta cgctgaggtn cagctncagc agtctgg	37
	<210> 231	
	<211> 27	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia está sintetizada	
40	<220>	
	<221> Incierto	
	<222> 13	
	<223> N es Adenina o Guanina	
45	<220>	
	<221> Incierto	
	<222> 19	
	<223> N es Adenina, Citosina, Guanina o Timina	
50	<220>	
	<221> Incierto	
	<222> 22	
	<223> N es Adenina o Guanina	
55	<220>	
	<221> Incierto	
	<222> 25	
	<223> N es Adenina, Citosina, Guanina o Timina	
60	<400> 231	
	gatcgatc canatgacnc anacnc	27
	<210> 232	
	<211> 37	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> La secuencia está sintetizada	
5	<220> <221> Incierto <222> 17 <223> N es Adenina o Guanina	
10	<220> <221> Incierto <222> 23 <223> N es Adenina o Guanina	
15	<220> <221> Incierto <222> 24 <223> N es Citosina o Timina	
20	<220> <221> Incierto <222> 32 <223> N es Adenina o Guanina	
25	<400> 232 gatcgacgta cgctgangtg canntgggtgg antctgg	37
30	<210> 233 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> La secuencia está sintetizada  <400> 233 gctgtaggtg ctgtctttgc t	21
40	<210> 234 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> La secuencia está sintetizada	
50	<220> <221> Incierto <222> 5 <223> N es Adenina o Timina	
55	<220> <221> Incierto <222> 11 <223> N es Adenina o Citosina  <400> 234 ctggncaggg ntccagagtt cca	23
60	<210> 235 <211> 108 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 235	

ES 2 585 350 T3

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

5  
 <210> 236  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Ratón  
 <400> 236

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

10  
 <210> 237  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 15 <213> *Macaca mulatta*  
 <400> 237

ES 2 585 350 T3

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

5  
 <210> 238  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 238

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

10  
 15  
 <210> 239  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 239

ES 2 585 350 T3

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

5 <210> 240  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 240

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

15 <210> 241  
 <211> 82  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> La secuencia está sintetizada  
 <400> 241

25 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

ES 2 585 350 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti Bv8, en el que el anticuerpo comprende:

- 5 (1) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;  
(2) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;  
(3) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63;  
(4) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;  
(5) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y  
10 (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

2. Un anticuerpo anti Bv8, en el que el anticuerpo comprende:

- 15 (1) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91;  
(2) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92;  
(3) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93;  
(4) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94;  
(5) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95; y  
20 (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

3. El anticuerpo anti Bv8 de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

4. El anticuerpo anti Bv8 de la reivindicación 2 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5. El anticuerpo anti Bv8 de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo anti Bv8 se une con Bv8 humano con valores de Kd menores de aproximadamente 0,02 nM.

6. El anticuerpo anti Bv8 de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo anti Bv8 se une con Bv8 humano de una forma al menos dos veces más estrecha que un anticuerpo anti Bv8 que comprende un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

7. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.

9. El vector de la reivindicación 8, en el que el vector es un vector de expresión.

10. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 8 o 9.

11. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que la composición comprende un vehículo.

13. La composición de la reivindicación 11 o 12, que es una composición farmacéutica.

14. Un método para preparar un anticuerpo anti Bv8, comprendiendo dicho método (a) expresar el vector de la reivindicación 8 o 9 en una célula hospedadora adecuada y (b) recuperar el anticuerpo.

15. El método de la reivindicación 14, en el que la célula hospedadora es procariota.

16. El método de la reivindicación 14, en el que la célula hospedadora es eucariota.

17. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento de un tumor, un cáncer, o un trastorno proliferativo celular, en el que el tratamiento comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo anti Bv8.

18. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, glioblastoma, cáncer esofágico, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer pancreático y carcinoma hepatocelular.

- 5 19. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-6 para uso en la reducción o inhibición de la angiogénesis en un sujeto que tiene tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, síndromes neovasculares intraoculares tales como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmunitario de tejido corneado trasplantado y otros tejidos, artritis reumatoide y psoriasis, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo anti Bv8, reduciendo o inhibiendo de este modo la angiogénesis en el sujeto.
- 10 20. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha afección patológica es una afección neoplásica.
- 15 21. El anticuerpo para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 17-20, en el que el uso comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo medicamento, en el que el anticuerpo anti Bv8 es el primer medicamento.
- 20 22. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el segundo medicamento es otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citocina, un antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, un vacuna de cáncer, un analgésico o un agente inhibidor del crecimiento.
- 25 23. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el segundo medicamento es un agente antiangiogénico.
24. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti VEGF.
- 30 25. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab.
26. El anticuerpo para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 17-25, que comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

Anticuerpo	L1														SEQ ID NO.	
	24	25	26	27	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33		34
2G9 quimérico	K	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	49
h2G9.K4G1.Polish	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	55
h2G9.K4G1.v19	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	61
h2G9.K4G1.v25	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	67
h2G9.K4G1.v27	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	73
h2G9.K4G1.v37	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	79
h2G9.K4G1.v52	K	A	S	Q	S	L	I	Y	G	A	D	S	Y	M	N	85
h2G9.K4G1.v55	K	A	S	Q	S	L	D	Y	Y	H	Y	S	Y	M	N	91
h2G9.K4G1.v63	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	97
h2G9.K4G1.v64	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	103
h2G9.K4G1.v65	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	109
h2G9.K4G1.v67	K	A	S	Q	S	L	D	Y	W	V	D	S	Y	M	N	115
h2G9.K4G1.v73	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	121
h2G9.K4G1.v75	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	127
h2G9.K4G1.v77	K	A	S	Q	S	V	D	Y	G	G	D	S	Y	M	N	133
h2G9.K4G1.v80	K	A	S	Q	S	V	D	Y	F	A	E	S	Y	M	N	139
h2G9.K4G1.v92	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	145
h2G9.K4G1.v19H/v55L	K	A	S	Q	S	L	D	Y	Y	H	Y	S	Y	M	N	151
2B9 quimérico	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	157
h2B9.v1	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	163
h2B9.v10	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	169
h2B9.v23	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	175
h2B9.v37	S	A	S	S	--	--	--	--	--	P	V	F	Y	M	H	181
h2B9.v56	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	187
h2B9.v76	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	193
3F1 quimérico	E	A	S	Q	S	V	D	Y	D	D	D	S	Y	M	N	199
h3F1.v1	E	A	S	Q	S	V	D	Y	D	D	D	S	Y	M	N	205
2D3 quimérico	K	S	S	E	--	--	--	--	Y	V	S	N	A	L	S	211

**FIG. 1A**

Anticuerpo	L2							SEQ ID NO.
	50	51	52	53	54	55	56	
2G9 quimérico	A	A	S	N	L	E	S	50
h2G9.K4G1.Polish	A	A	S	N	L	E	S	56
h2G9.K4G1.v19	A	A	S	N	L	E	S	62
h2G9.K4G1.v25	A	A	S	N	L	E	S	68
h2G9.K4G1.v27	A	A	S	N	L	E	S	74
h2G9.K4G1.v37	A	A	S	N	L	E	S	80
h2G9.K4G1.v52	A	A	S	N	R	E	T	86
h2G9.K4G1.v55	A	A	S	N	R	E	S	92
h2G9.K4G1.v63	A	A	S	N	L	E	T	98
h2G9.K4G1.v64	A	A	S	N	R	E	S	104
h2G9.K4G1.v65	A	A	S	N	L	E	S	110
h2G9.K4G1.v67	A	A	S	N	R	E	T	116
h2G9.K4G1.v73	A	A	S	N	L	E	S	122
h2G9.K4G1.v75	A	A	S	N	L	E	S	128
h2G9.K4G1.v77	A	A	S	N	R	E	T	134
h2G9.K4G1.v80	A	A	S	Y	R	E	S	140
h2G9.K4G1.v92	A	A	S	N	L	E	S	146
h2G9.K4G1.v19H/v55L	A	A	S	N	R	E	S	152
2B9 quimérico	D	T	S	K	L	A	S	158
h2B9.v1	D	T	S	K	L	A	S	164
h2B9.v10	D	T	S	K	L	A	S	170
h2B9.v23	D	T	S	K	L	A	S	176
h2B9.v37	D	T	S	N	L	A	S	182
h2B9.v56	D	T	S	K	L	A	S	188
h2B9.v76	D	T	S	K	L	A	S	194
3F1 quimérico	A	T	S	N	L	A	S	200
h3F1.v1	A	T	S	N	L	A	S	206
2D3 quimérico	G	T	N	K	L	E	D	212

**FIG. 1B**

Anticuerpo	L3									SEQ ID NO.
	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
2G9 quimérico	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	51
h2G9.K4G1.Polish	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	57
h2G9.K4G1.v19	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	63
h2G9.K4G1.v25	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	69
h2G9.K4G1.v27	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	75
h2G9.K4G1.v37	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	81
h2G9.K4G1.v52	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	87
h2G9.K4G1.v55	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	93
h2G9.K4G1.v63	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	99
h2G9.K4G1.v64	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	105
h2G9.K4G1.v65	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	111
h2G9.K4G1.v67	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	117
h2G9.K4G1.v73	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	123
h2G9.K4G1.v75	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	129
h2G9.K4G1.v77	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	135
h2G9.K4G1.v80	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	141
h2G9.K4G1.v92	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	147
h2G9.K4G1.v19H/v55L	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	153
2B9 quimérico	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	159
h2B9.v1	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	165
h2B9.v10	Q	Q	W	S	F	D	P	I	T	171
h2B9.v23	Q	Q	W	S	W	E	P	L	T	177
h2B9.v37	Q	Q	W	S	Y	E	P	L	T	183
h2B9.v56	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	189
h2B9.v76	Q	Q	W	S	Y	D	P	M	T	195
3F1 quimérico	Q	Q	S	N	E	D	P	F	T	201
h3F1.v1	Q	Q	S	N	E	D	P	F	T	207
2D3 quimérico	Q	Q	G	Y	D	I	P	-	T	213

**FIG. 1C**

Anticuerpo	H1												SEQ ID NO.
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	
2G9 quimérico	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	52
h2G9.K4G1.Polish	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	58
h2G9.K4G1.v19	G	Y	S	L	T	N	Y	D	M	H	--	--	64
h2G9.K4G1.v25	G	Y	S	L	F	H	Y	D	M	H	--	--	70
h2G9.K4G1.v27	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	76
h2G9.K4G1.v37	G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	--	--	82
h2G9.K4G1.v52	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	88
h2G9.K4G1.v55	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	94
h2G9.K4G1.v63	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	100
h2G9.K4G1.v64	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	106
h2G9.K4G1.v65	G	Y	T	F	M	H	Y	D	M	H	--	--	112
h2G9.K4G1.v67	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	118
h2G9.K4G1.v73	G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	--	--	124
h2G9.K4G1.v75	G	Y	T	F	P	I	Y	D	M	H	--	--	130
h2G9.K4G1.v77	G	Y	T	F	T	E	Y	D	M	H	--	--	136
h2G9.K4G1.v80	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	142
h2G9.K4G1.v92	G	Y	S	F	V	H	Y	D	M	H	--	--	148
h2G9.K4G1.v19H/v55L	G	Y	S	L	T	N	Y	D	M	H	--	--	154
2B9 quimérico	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	160
h2B9.v1	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	166
h2B9.v10	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	172
h2B9.v23	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	178
h2B9.v37	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	184
h2B9.v56	G	F	Y	I	S	T	P	G	M	G	V	S	190
h2B9.v76	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	196
3F1 quimérico	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	--	--	202
h3F1.v1	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	--	--	208
2D3 quimérico	G	F	T	F	S	D	Y	F	M	G	--	--	214

**FIG. 1D**

Anticuerpo	H2															SEQ ID NO.		
	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63		64	65
2G9 quimérico	Y	I	S	C	Y	N	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	53
h2G9.K4G1.Polish	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	59
h2G9.K4G1.v19	Y	I	H	S	Y	S	G	S	T	L	Y	N	Q	K	F	K	G	65
h2G9.K4G1.v25	Y	I	S	T	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	71
h2G9.K4G1.v27	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	77
h2G9.K4G1.v37	Y	I	S	T	Y	A	G	E	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	83
h2G9.K4G1.v52	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	89
h2G9.K4G1.v55	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	95
h2G9.K4G1.v63	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	101
h2G9.K4G1.v64	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	107
h2G9.K4G1.v65	Y	I	S	S	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	113
h2G9.K4G1.v67	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	119
h2G9.K4G1.v73	Y	I	S	S	Y	L	G	A	T	I	Y	N	Q	K	F	K	G	125
h2G9.K4G1.v75	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	131
h2G9.K4G1.v77	Y	I	T	T	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	137
h2G9.K4G1.v80	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	143
h2G9.K4G1.v92	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	149
h2G9.K4G1.v19H/v55L	Y	I	H	S	Y	S	G	S	T	L	Y	N	Q	K	F	K	G	155
2B9 quimérico	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	161
h2B9.v1	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	167
h2B9.v10	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	173
h2B9.v23	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	179
h2B9.v37	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	185
h2B9.v56	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	191
h2B9.v76	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	197
3F1 quimérico	R	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	203
h3F1.v1	R	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	209

Anticuerpo	H2															SEQ ID No.				
	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61		62	63	64	65
2D3 quimérico	G	I	D	T	K	S	Y	N	Y	A	T	Y	Y	S	G	S	V	K	G	215

**FIG. 1E**

Anticuerpo	H3												SEQ ID NO.
	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102	
2G9 quimérico	D	G	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	54
h2G9.K4G1.Polish	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	60
h2G9.K4G1.v19	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	66
h2G9.K4G1.v25	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	72
h2G9.K4G1.v27	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	78
h2G9.K4G1.v37	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	84
h2G9.K4G1.v52	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	90
h2G9.K4G1.v55	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	96
h2G9.K4G1.v63	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	102
h2G9.K4G1.v64	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	108
h2G9.K4G1.v65	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	114
h2G9.K4G1.v67	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	120
h2G9.K4G1.v73	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	126
h2G9.K4G1.v75	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	132
h2G9.K4G1.v77	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	138
h2G9.K4G1.v80	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	144
h2G9.K4G1.v92	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	150
h2G9.K4G1.v19H/v55L	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	156
2B9 quimérico	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	T	Y	162
h2B9.v1	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	T	Y	168
h2B9.v10	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	174
h2B9.v23	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	180
h2B9.v37	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	186
h2B9.v56	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	192
h2B9.v76	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	198
3F1 quimérico	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	204
h3F1.v1	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	210
2D3 quimérico	N	Y	G	N	Y	G	A	--	--	F	D	S	216

**FIG. 1F**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **- L1 -** WYQKPGQPPKLLIY **- L2 -**  
 ----->  
 L -- --> GVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC **- L3 -** FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:240)  
 ----->  
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS **- H1 -** WVRQAPGQGLEWIG **- H2 -**  
 ----->  
 L -- --> RVTITVDKSTSTAYLLELSSLRSEDVAVYYCAR **- H3 -** WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:241)  
 ----->

**FIG. 1G**

FIG. 2A



FIG. 2A-1

N.º de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36							
huKIV	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	K	N	Y	L	A	N	Y	
2G9 de ratón/quimérico	D	I	V	I	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	S	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	D	G	D	S	Y	M	N	N	Y
h2G9.K4.Polish	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	Y
h2G9.K4.v19	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	Y
h2G9.K4.v52	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	Y
h2G9.K4.v55	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	Y
h2G9.K4.v73	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	Y
h2G9.K4.v19H/v55L	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	Y

N.º de Kabat 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

2G9 de ratón/quimérico huK1V	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A S S T R E S G V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	Kabat - CDR L2 Choithia - CDR L2 Contacto - CDR L2
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N L E S S G C I P P A R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N L E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N L E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N L E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N R R E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N R R E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N L E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N R R E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	
	Q Q X P G Q P P K L L I Y Y A A S N R R E S S G C V P D R R F S G S G S G T D F T L T I S S L	

N.º de Kabat 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

2G9 de ratón/quimérico huK1V	Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:1	Kabat - CDR L3 Choithia - CDR L3 Contacto - CDR L3
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:3	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:5	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:7	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:9	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:11	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:13	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:15	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:15	
	Q A E D V A V Y Y C Q Q I N E D P P F I F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO:15	

□ Destaca la diferencia de marco conservado entre 2G9 de ratón y kappa consenso humana IV (14)  
 □ Destaca la diferencia de CDR entre 2G9 de ratón y variantes de 2G9 humanizadas

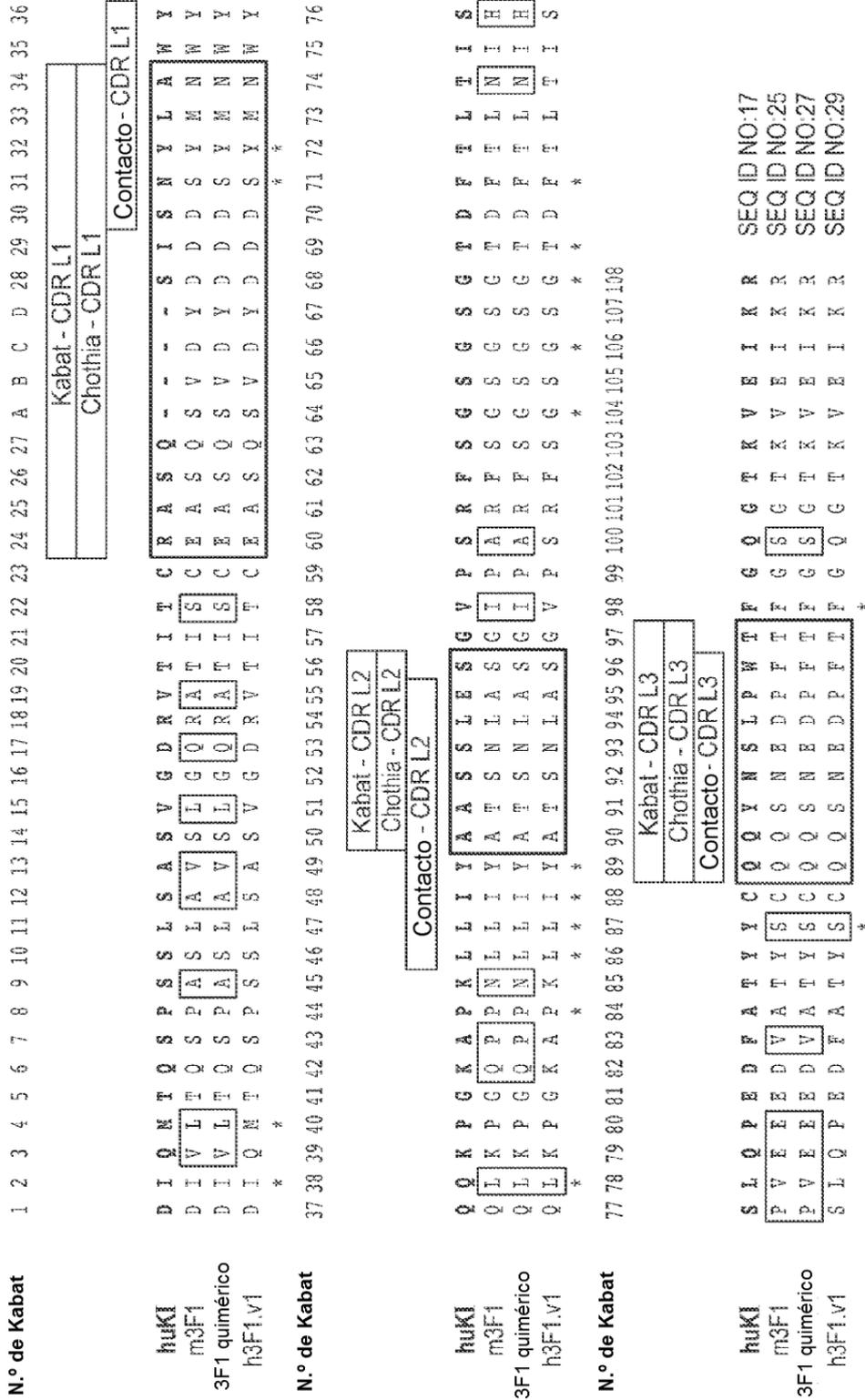
FIG. 2A-2











Destaca la diferencia de marco conservado entre 3F1 de ratón y Kappa consenso humano I (24)

**FIG. 4A**







**FIG. 6A**

FIG. 6A-1  
 FIG. 6A-2

**FIG. 6A-1**

N.º de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
huK1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	
2B9 ratón/quimérico	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	H	W	Y
h2B9.v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	N	H	H	W	Y
h2B9.v10	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	H	W	Y
h2B9.v23	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	H	W	Y
h2B9.v37	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	H	W	Y
h2B9.v56	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	H	W	Y
h2B9.v76	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	H	W	Y

Kabat - CDR L1  
 Chothia - CDR L1  
 Contacto - CDR L1

N.º de Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
huKI	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
2B9 ratón/quimérico	Q	Q	K	P	S	G	T	S	P	K	T	W	I	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
h2B9.v1	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
h2B9.v10	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
h2B9.v23	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
h2B9.v37	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
h2B9.v56	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
h2B9.v76	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S		
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N.º de Kabat	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108								
huKI	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	P	G	Q	G	T	R	V	E	I	K	R								
2B9 ratón/quimérico	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R								
h2B9.v1	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R								
h2B9.v10	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R								
h2B9.v23	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R								
h2B9.v37	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R								
h2B9.v56	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R								
h2B9.v76	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R								
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

□ Destaca de la diferencia de marco: conservado entre 2B9 de ratón/humanizado y Kappa consenso humana I  
 □ Destaca la diferencia de CDR entre 2B9 de ratón y variantes 2B9 humanizadas

FIG. 6A-2



FIG. 6B-1

N.º de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	N	W	V	R	Q	A	
2B9 ratón/quimérico	Q	V	T	L	L	E	S	G	P	G	I	L	Q	P	S	Q	I	L	S	L	L	T	C	S	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A
h2B9.v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	I	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A	
h2B9.v10	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	I	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A	
h2B9.v23	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	I	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A	
h2B9.v37	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	I	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A	
h2B9.v56	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	I	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A	
h2B9.v76	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	I	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A	

N.º de Kabat 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

		Kabat - CDR H2																																												
		Choithia - CDR H2										Contacto - CDR H2																																		
hum III		P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	I	L	Q			
2B9 ratón/quimérico	S	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v1		P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v10		P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v23		P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v37		P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v56		P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v76		P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	L	T	I	S	K	D	T	S	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q

N.º de Kabat 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D 101 102 103 104 105 106 107

		Kabat - CDR H3																																							
		Choithia - CDR H3										Contacto - CDR H3																													
hum III		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
2B9 ratón/quimérico	I	T	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q	
h2B9.v1		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v10		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v23		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v37		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v56		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q
h2B9.v76		M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	F	I	S	R	D	N	S	K	N	T	V	Y	L	L	Q

□ Destaca la diferencia de marco conservado entre 2B9 de ratón/humanizado y subgrupo consenso humano III

⋯ Destaca la diferencia de CDR entre 2B9 de ratón y variantes 2B9 humanizadas

FIG. 6B-2

**FIG. 7**  
 FIG. 7A  
 FIG. 7B

**FIG. 7A**

N.º de Kabat	Kabat - CDR L1																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36						
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y		
m2G9	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y		
h2G9.K1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y	
huKIV	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	N	K	H	Y	L	A	W	Y
m2G9	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y		
h2G9.K4	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y	

Kabat - CDR L1  
 Choithia - CDR L1

Contacto - CDR L1

N.º de Kabat 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

	Kabat - CDR L2			Chothia - CDR L2			Contacto - CDR L2																																			
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
huKI	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
m2G9	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	E	P	V
h2G9.K1	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
huKIV	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L		
m2G9	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	E	P	V		
h2G9.K4	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L		

N.º de Kabat 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

	Kabat - CDR L3			Chothia - CDR L3			Contacto - CDR L3																							
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
huKI	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
m2G9	E	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	F	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
h2G9.K1	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
huKIV	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	T	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
m2G9	E	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	F	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
h2G9.K4	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

□ Destaca la diferencia de marco conservado entre 2G9 murino y Kappa consenso humano I (20)

□ Destaca la diferencia de marco conservado entre 2G9 murino y Kappa consenso humano IV (14)

FIG. 7B

**FIG. 8**  
 FIG. 8A  
 FIG. 8B

**FIG. 8A**

N.º de Kabat											Kabat - CDR H1										Choihia - CDR H1										Contacto -- CDR H1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40
hum I	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	I	H	-	-	W	V	R	Q	A
m2G9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	E	V	V	K	K	T	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	K	Q	S
h2G9.G1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	N	W	V	R	Q	A	
m2G9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	E	V	V	K	K	T	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	K	Q	S
h2G9.G3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	

N.º de Kabat 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

	Kabat - CDR H2																									
	Chothia - CDR H2																									
	Contacto - CDR H2																									
hum I	P	G	Q	G	L	E	N	I	G	W	I	N	P	G	S	G	N	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G
m2G9	Q	G	K	S	L	E	N	I	G	Y	I	S	C	Y	N	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.G1	P	G	Q	G	L	E	N	I	G	Y	I	S	C	Y	N	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
hum III	P	G	K	G	L	E	N	V	S	V	I	S	G	D	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
m2G9	Q	G	K	S	L	E	N	I	G	Y	I	S	C	Y	N	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.G3	P	G	K	G	L	E	N	V	G	Y	I	S	C	Y	N	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G

N.º de Kabat 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

	Kabat - CDR H3																																							
	Chothia - CDR H3																																							
	Contacto - CDR H3																																							
hum I	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:2				
m2G9	F	N	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	C	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	L	T	V	S	S	SEQ ID NO:4
h2G9.G1	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	C	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:221
hum III	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:222				
m2G9	F	N	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	C	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	L	T	V	S	S	SEQ ID NO:223
h2G9.G3	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	C	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:224

- Destaca la diferencia de marco conservado entre 2G9 murino y subgrupo consenso humano I (25)
- Destaca la diferencia de marco conservado entre 2G9 murino y subgrupo consenso humano III (34)
- Destaca la diferencia de marco conservado entre 2G9 murino y subgrupo consenso humano I (2) y III (4)

FIG. 8B

Biblioteca suave de L1/L2

ID	CDR-L1													CDR-L2								
	24	25	26	27	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56
h2G9.K4G1.Polish	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	L	E	S
h2G9.K4G1.v27	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	L	E	S
h2G9.K4G1.v52	K	A	S	Q	S	L	I	Y	G	A	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	T
h2G9.K4G1.v55	K	A	S	Q	S	L	D	Y	Y	H	Y	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	S
h2G9.K4G1.v63	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	L	E	T
h2G9.K4G1.v64	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	S
h2G9.K4G1.v67	K	A	S	Q	S	L	D	Y	W	V	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	T
h2G9.K4G1.v77	K	A	S	Q	S	V	D	Y	G	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	T
h2G9.K4G1.v80	K	A	S	Q	S	V	D	Y	F	A	E	S	Y	M	N	A	A	S	Y	R	E	S

Biblioteca suave de L1/L2

ID	CDR-L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
h2G9.K4G1.Polish	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v27	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v52	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v55	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v63	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v64	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v67	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v77	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T
h2G9.K4G1.v80	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T

FIG. 9

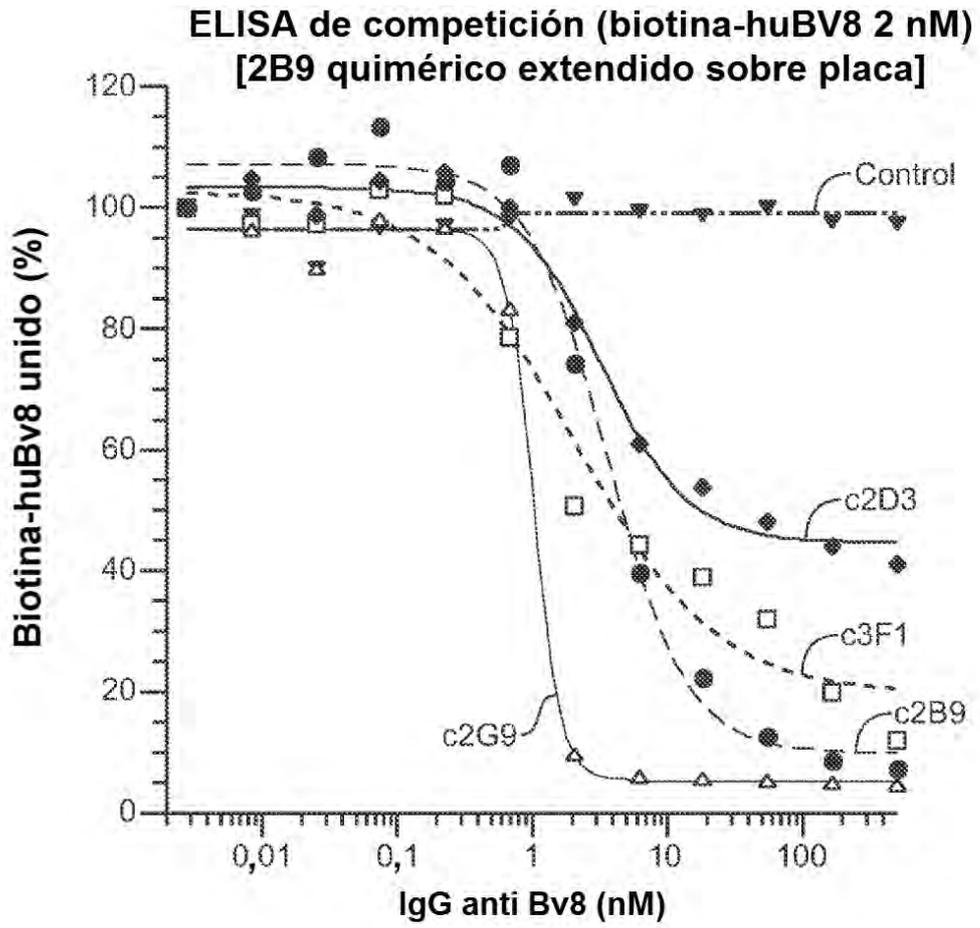
Biblioteca suave de H1/H2

ID	CDR-H1										CDR-H2																
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
h2G9.K4G1.Polish	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v19	G	Y	S	L	T	N	Y	D	M	H	Y	I	H	S	Y	S	G	S	T	L	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v25	G	Y	S	L	F	H	Y	D	M	H	Y	I	S	T	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v37	G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	Y	I	S	T	Y	A	G	E	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v65	G	Y	T	F	M	H	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v73	G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	L	G	A	T	I	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v75	G	Y	T	F	P	I	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v77	G	Y	T	F	T	E	Y	D	M	H	Y	I	T	T	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
h2G9.K4G1.v92	G	Y	S	F	V	H	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G

Biblioteca suave de H1/H2

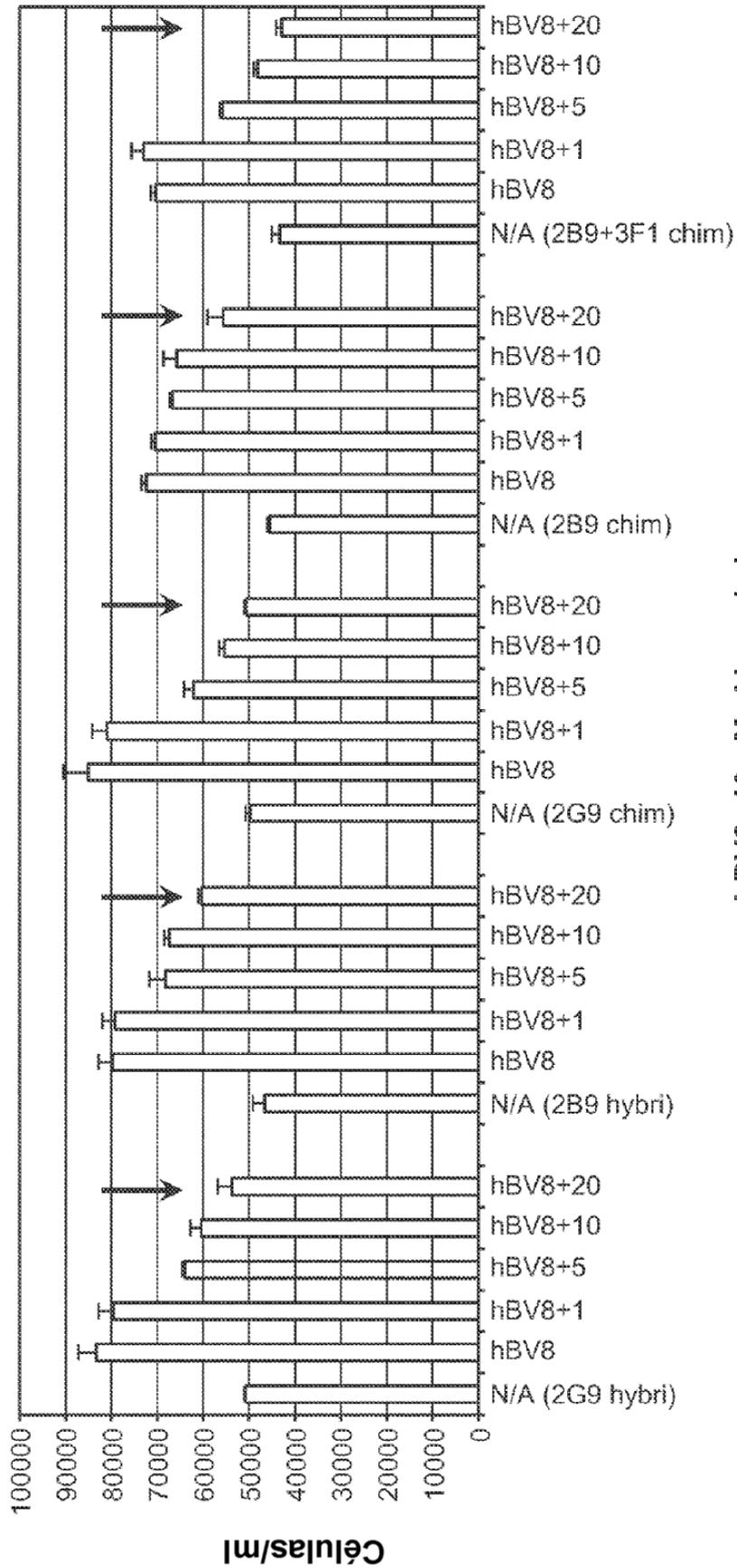
ID	CDR-H3											
	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102
h2G9.K4G1.Polish	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v19	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v25	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v37	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v65	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v73	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v75	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v77	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y
h2G9.K4G1.v92	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y

FIG. 10



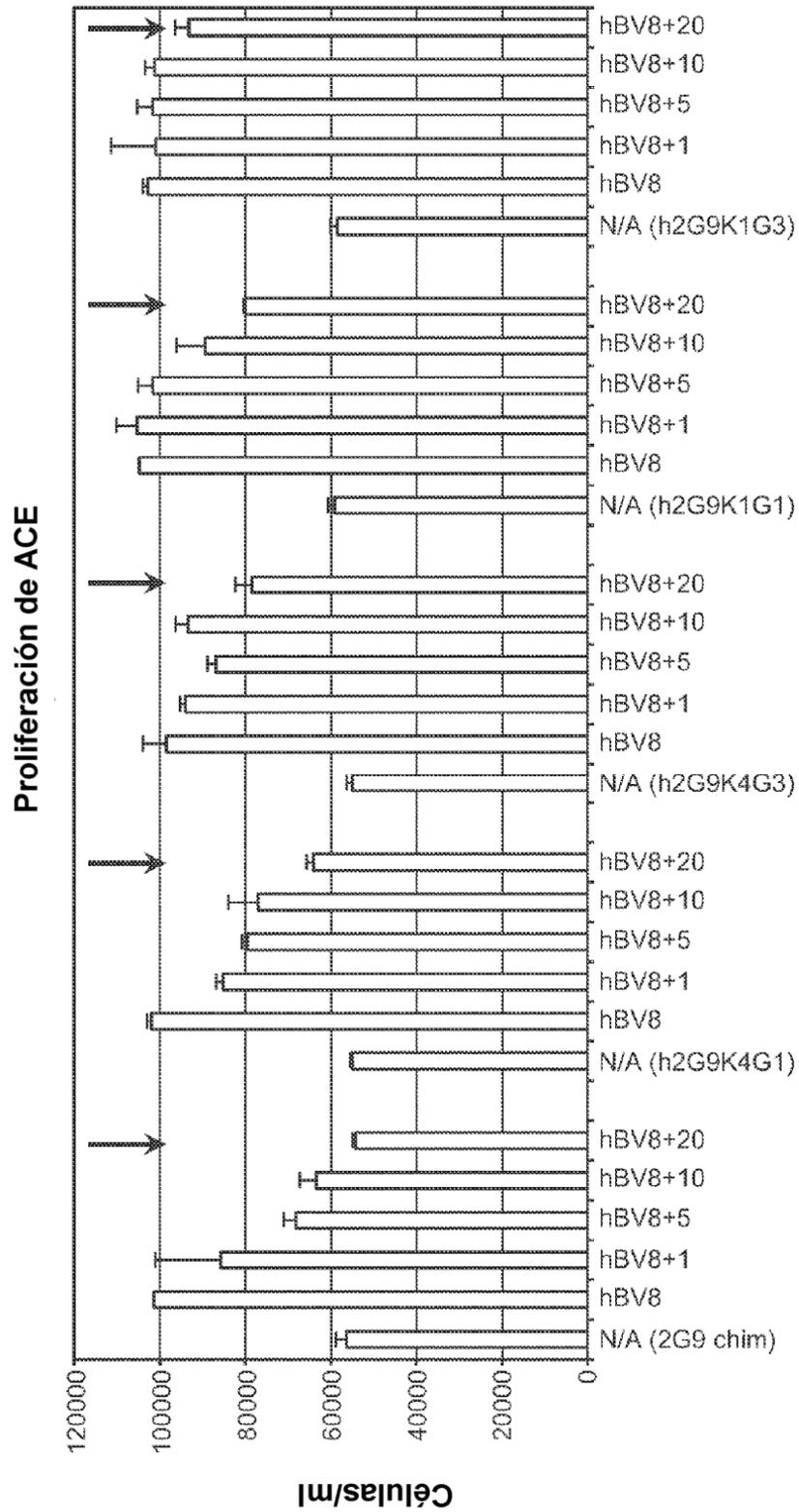
**FIG. 11**

**Ensayo de proliferación de ACE  
Células endoteliales corticales adrenales (ACE)**



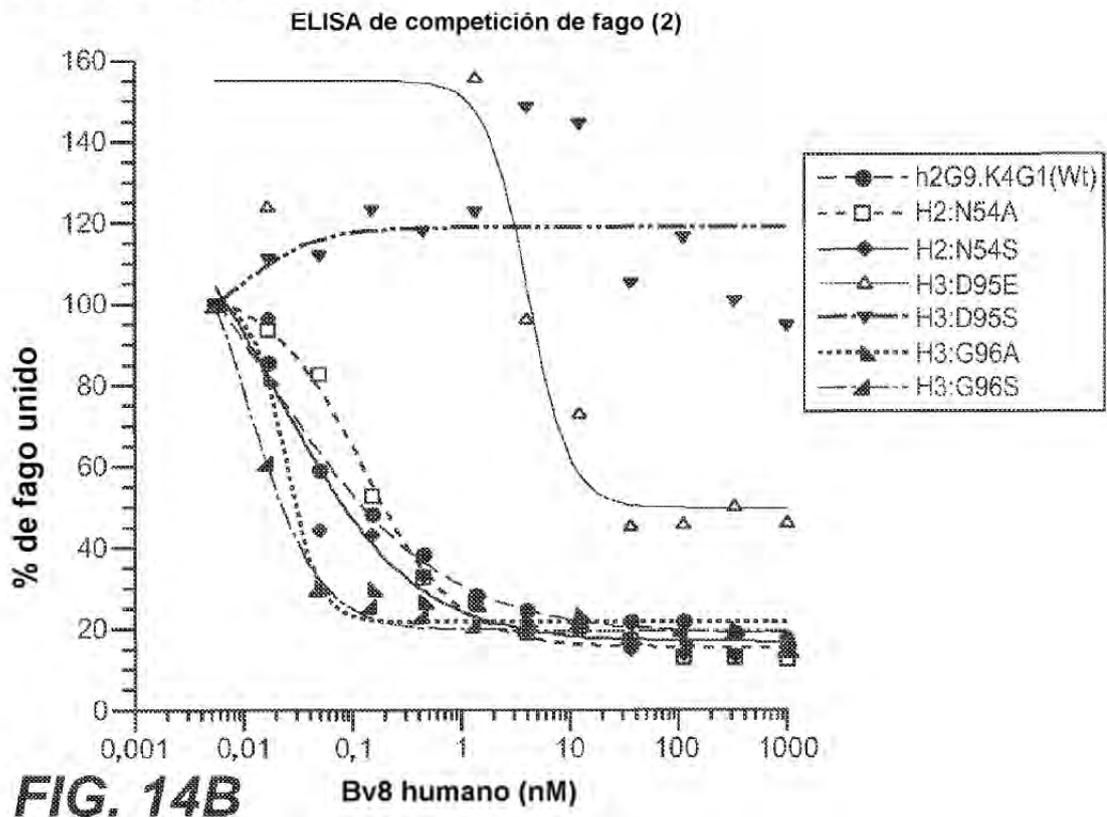
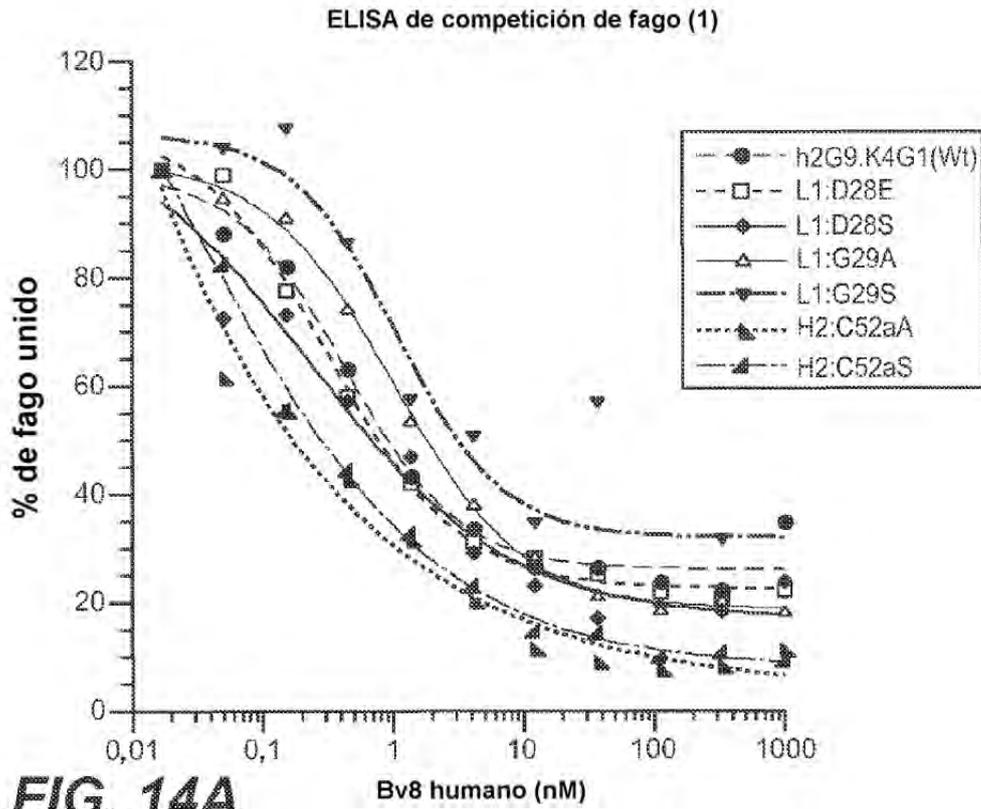
hBV8: 10 nM, Ab: ug/ml

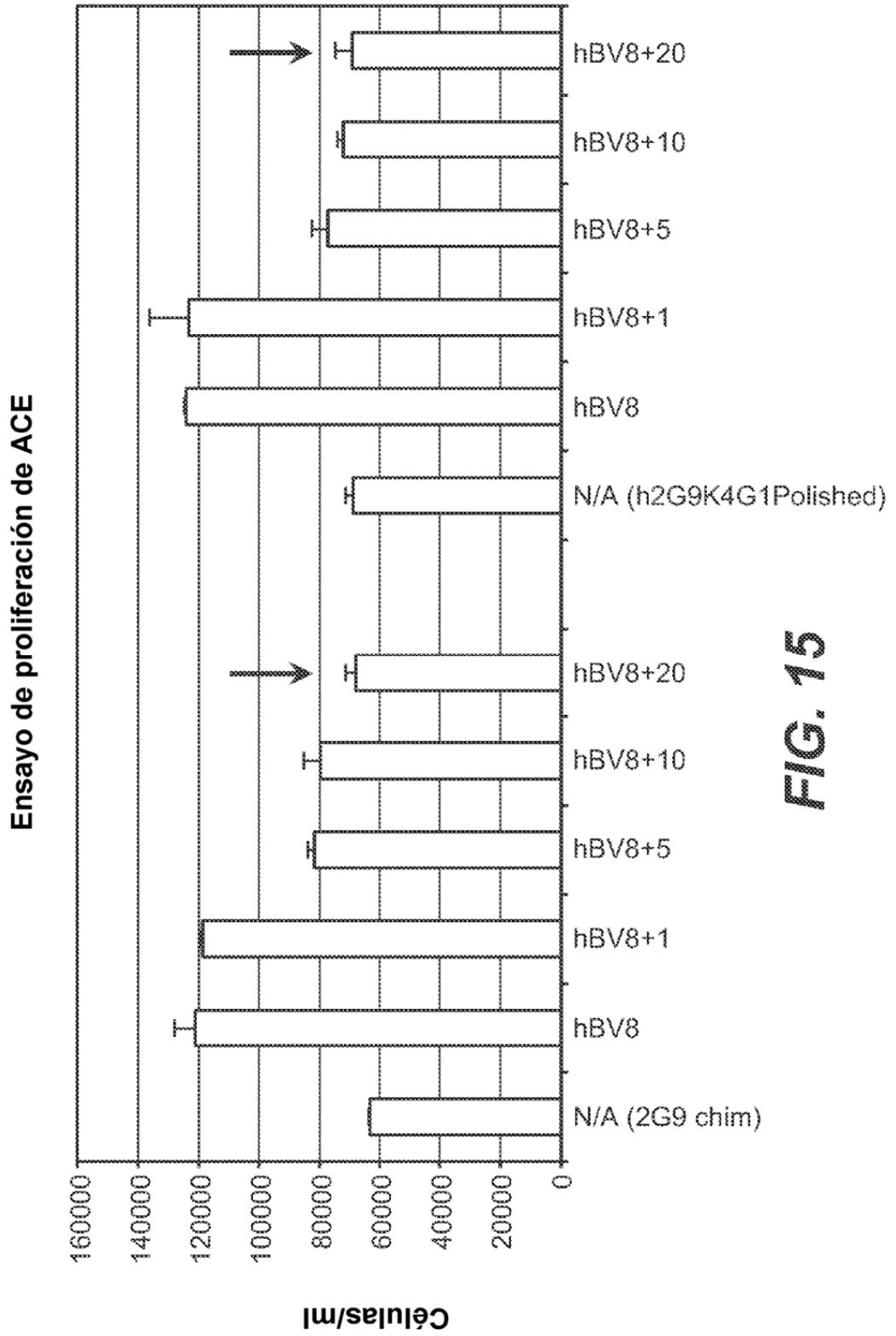
**FIG. 12**



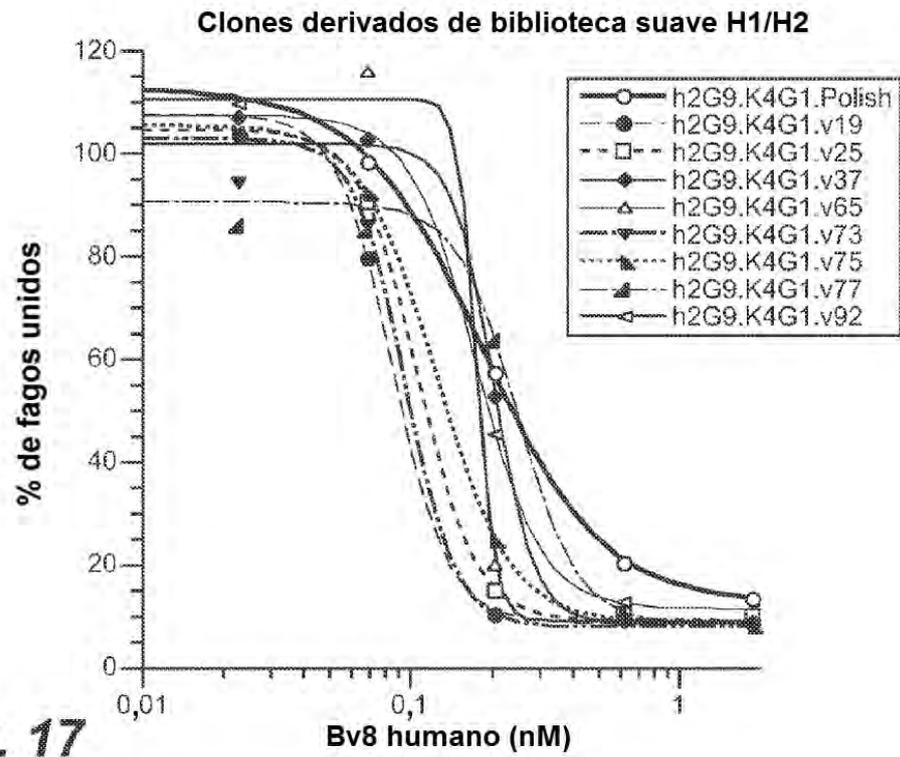
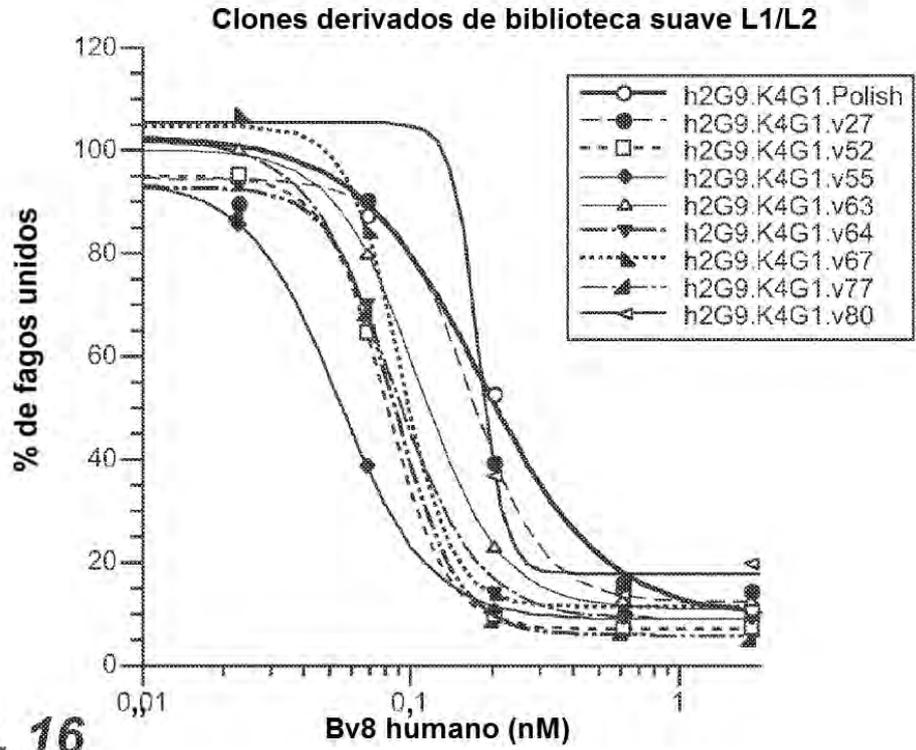
**Actividad: Quimérico 2G9 > h2G9.K4G1 > h2G9.K4G3 ~ h2G9.K1G1 > h2G9.K1G3**

**FIG. 13**





**FIG. 15**



**FIG. 18**

Analitos	Bv8 humano (N=3)		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$
h2G9.K4G1.Polish	4,75 ± 0,45	6,89 ± 1,13	1,44 ± 0,11
h2G9.K4G1.V19	4,71 ± 0,21	0,38 ± 0,02	0,08 ± 0,01
h2G9.K4G1.V52	4,43 ± 0,49	1,19 ± 0,32	0,27 ± 0,04
h2G9.K4G1.V55	4,84 ± 0,29	1,36 ± 0,06	0,28 ± 0,01
h2G9.K4G1.V73	3,52 ± 0,21	0,50 ± 0,01	0,14 ± 0,01

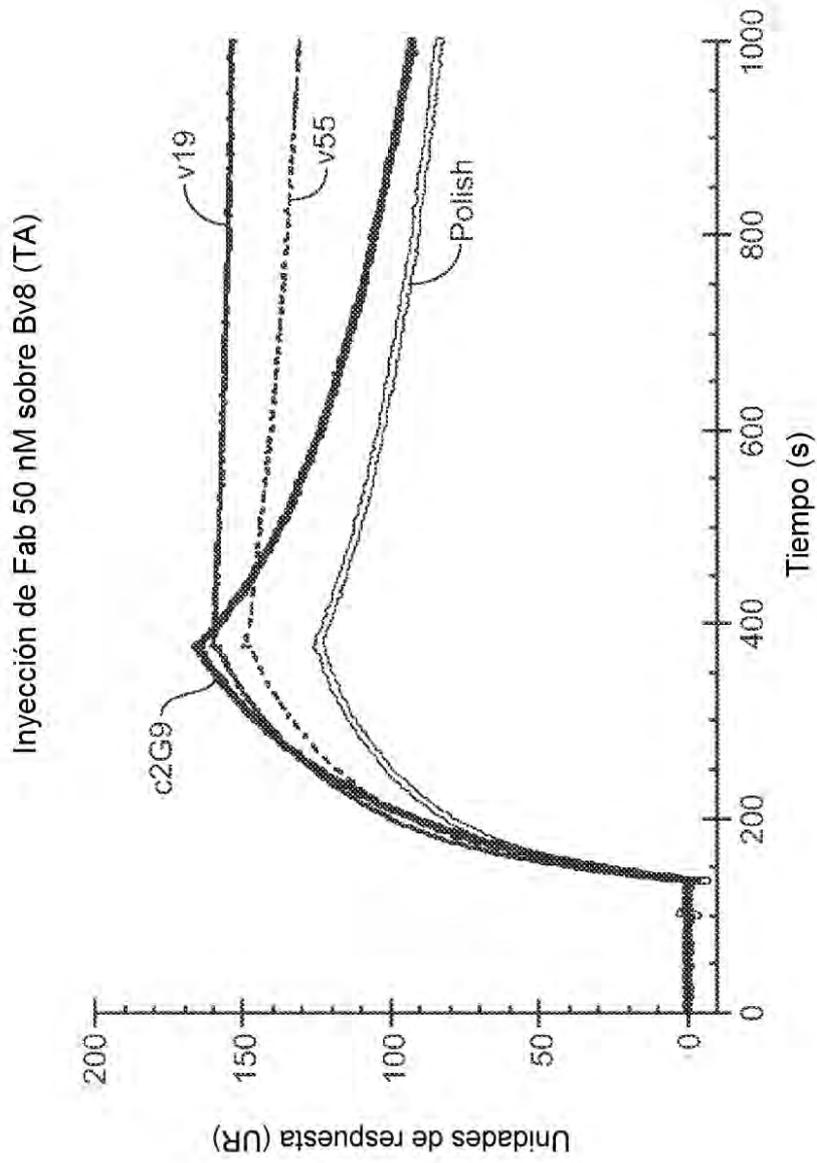
**FIG. 19**

Clones anti-BV8 humanizados	Bv8 humano			Bv8 de cino		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$
V19 Fab	3,59	0,16	0,04	2,67	0,28	0,10
V55 Fab	3,96	0,72	0,18	3,1	1,29	0,42

Clones anti-BV8 humanizados	Bv8 humano			Bv8 de cino		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$
V19 IgG	7,60	<sup>2</sup> 0,05 *	<sup>2</sup> 0,007 *	5,01	<sup>2</sup> 0,05 *	<sup>2</sup> 0,009 *
V55 IgG	9,5	<sup>2</sup> 0,05 *	<sup>2</sup> 0,005 *	7,8	<sup>2</sup> 0,05 *	<sup>2</sup> 0,006 *

\* La constante de velocidad de disociación observada durante 30 minutos a 25 °C fue exactamente o casi el límite de detección del instrumento (BIAcore 3000); por lo tanto los  $K_{off}$  y  $K_D$  indicados son límites superiores.



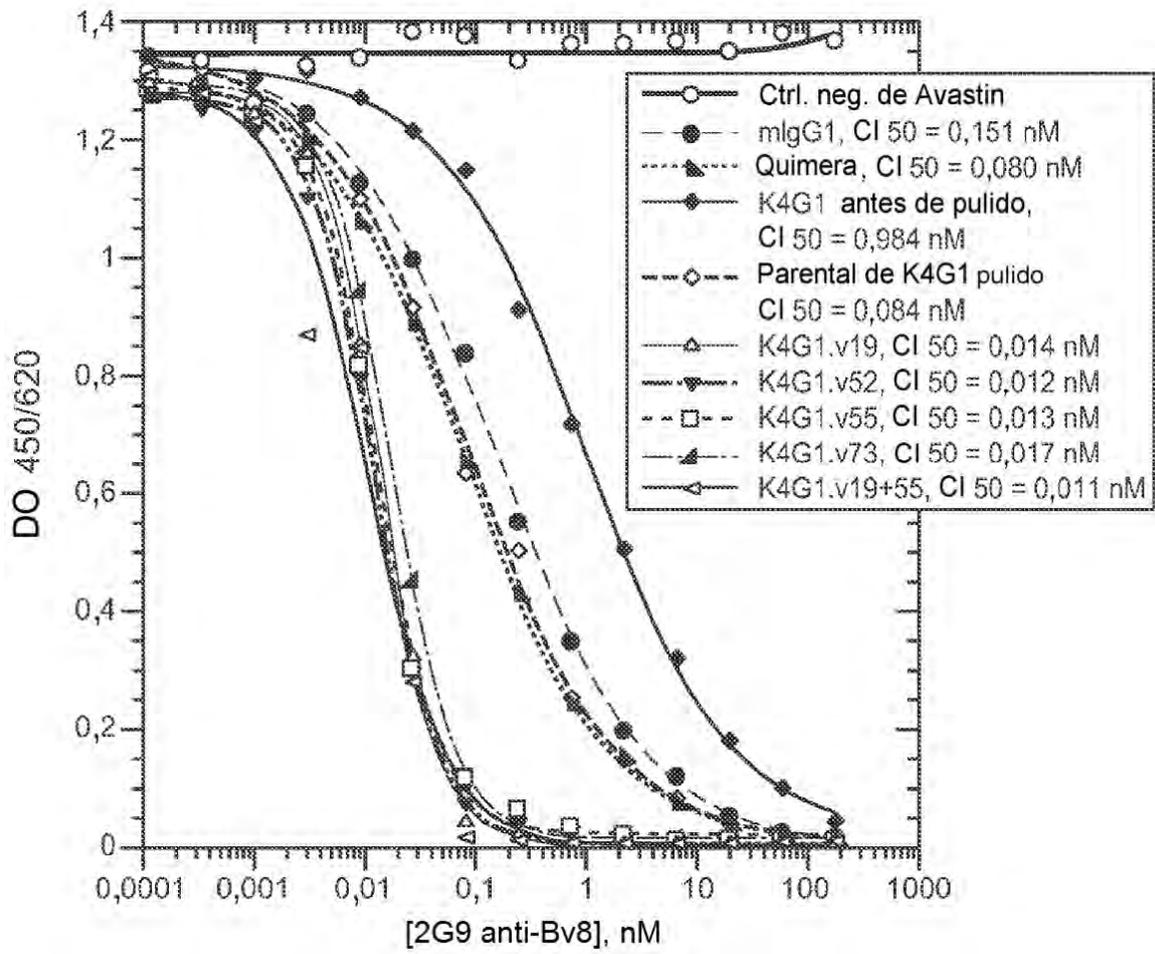
**FIG. 20**

**Análisis de BIAcore de IgG de variantes de 2G9**

Clones anti-BV8 humanizados	Bv8 humano				Bv8 de cino			
	$k_{on}(10^5M^{-1}S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4}S^{-1})$	$K_D(nM)$	$k_{on}(10^5M^{-1}S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4}S^{-1})$	$K_D(nM)$		
2G9 quimérico	7,58	0,18	0,02	6,46	0,25	0,04		
h2G9.K4G1.Polish	5,28	0,12	0,02	4,54	0,15	0,03		
h2G9.K4G1.V19	7,60	20,05 *	20,007 *	5,01	20,05 *	20,009 *		
h2G9.K4G1.V55	9,45	20,05 *	20,005 *	7,75	20,05 *	20,006 *		

\* La constante de velocidad de disociación observada durante 30 minutos a 25 °C fue exactamente o casi el límite de detección del instrumento (BIAcore 3000); por lo tanto los  $K_{off}$  y  $K_D$  indicados son límites superiores.

**FIG. 21**



**FIG. 22**

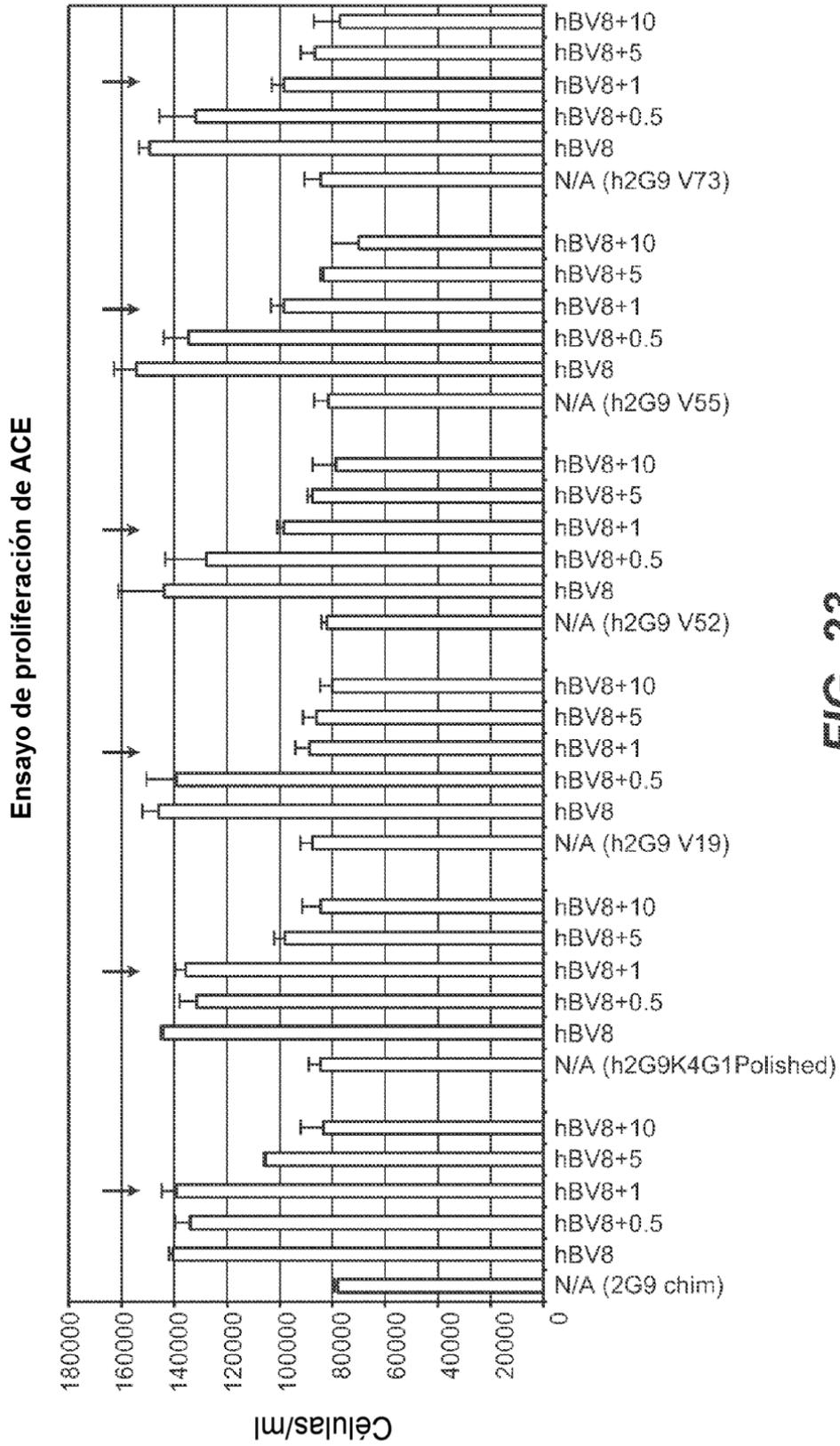


FIG. 23

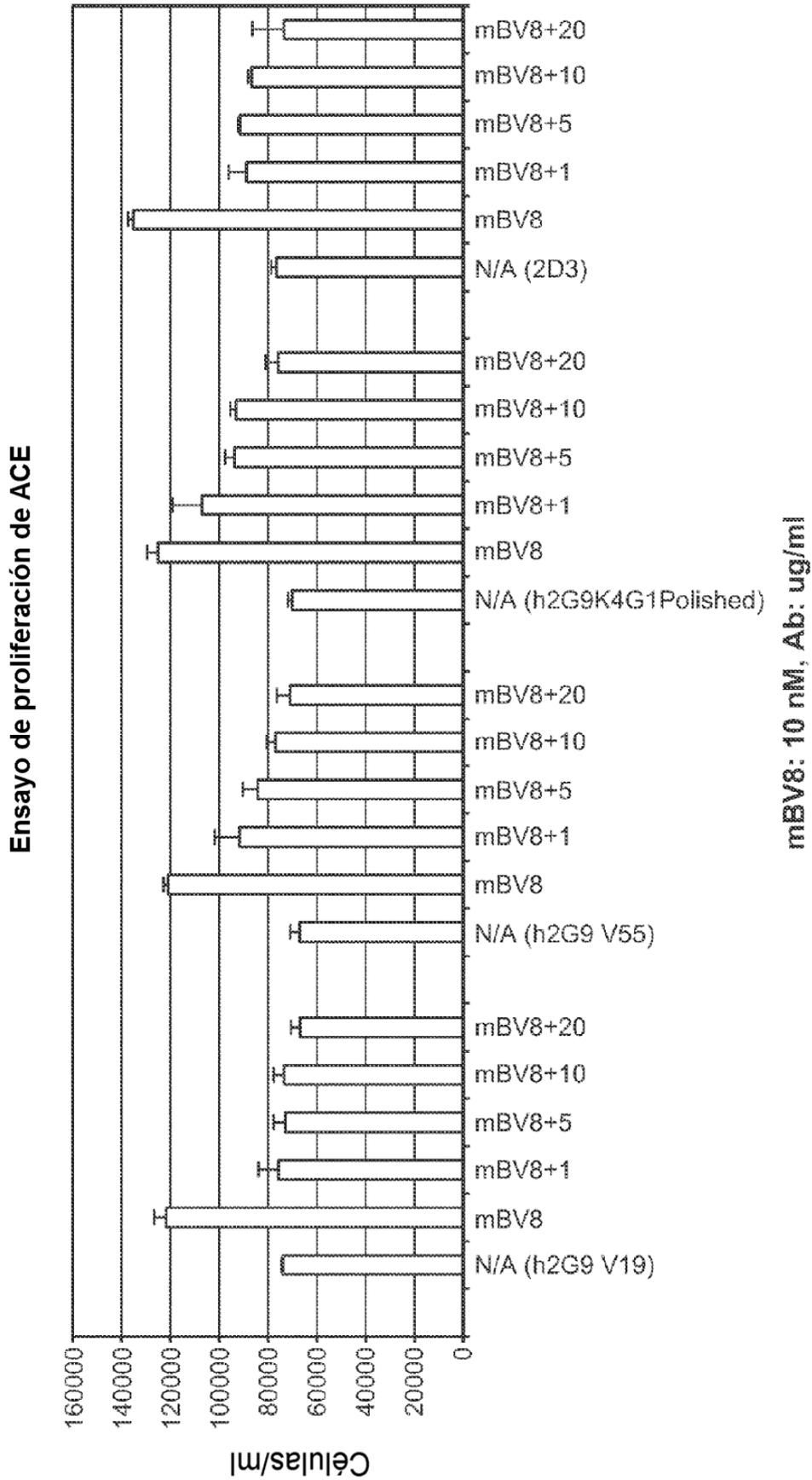


FIG. 24

Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, 3F1, 2B9 o 2G9 en cáncer de colon humano HM7 en ratones desnudos Balb-c

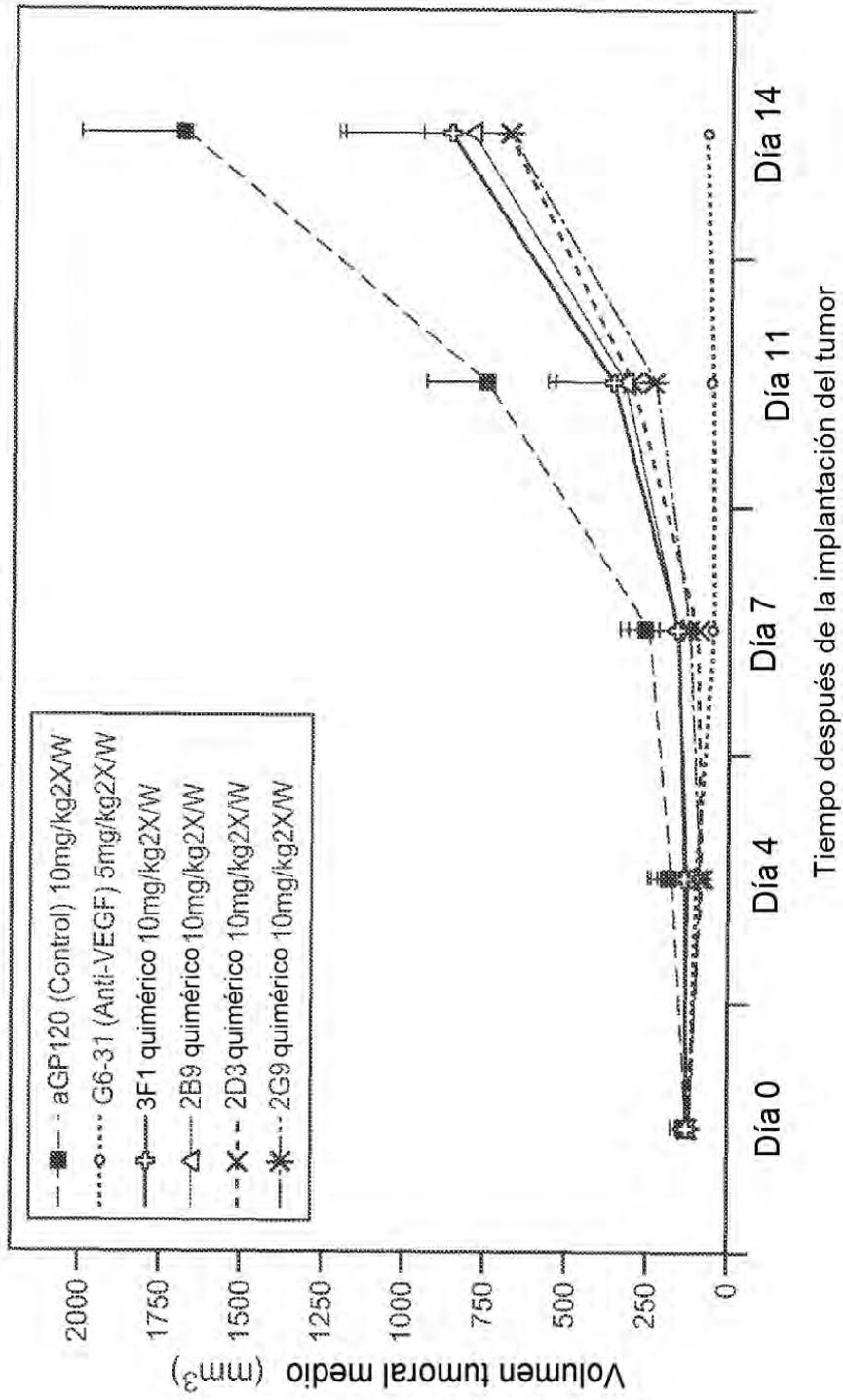
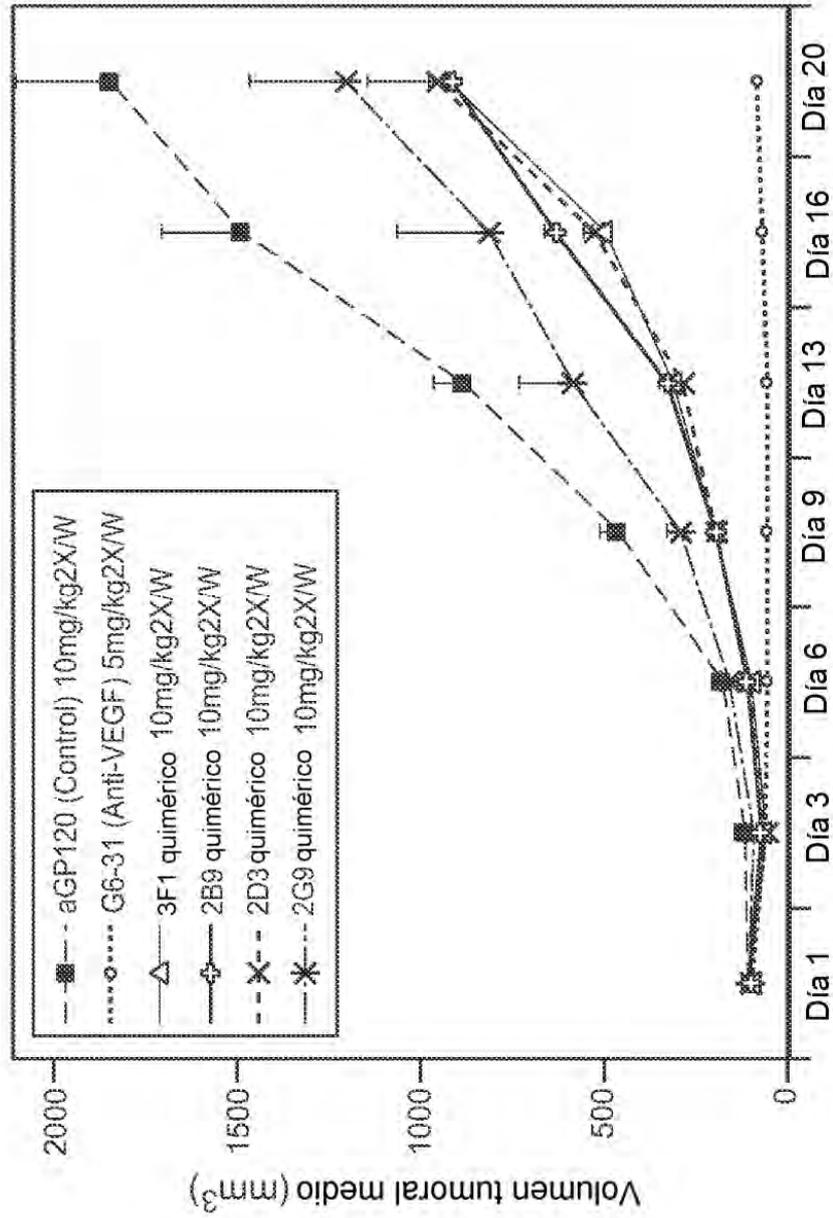


FIG. 25

Comparación de la eficacia de anticuerpos de anti-BV8 quiméricos 2D3, 3F1, 2G9 o 2B9 en cáncer de rabdomioma humano A673 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después del inicio del tratamiento farmacológico

FIG. 26

Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, 3F1, 2G9 o 2B9 en cáncer de colon humano HT55 en ratones desnudos Balb-c

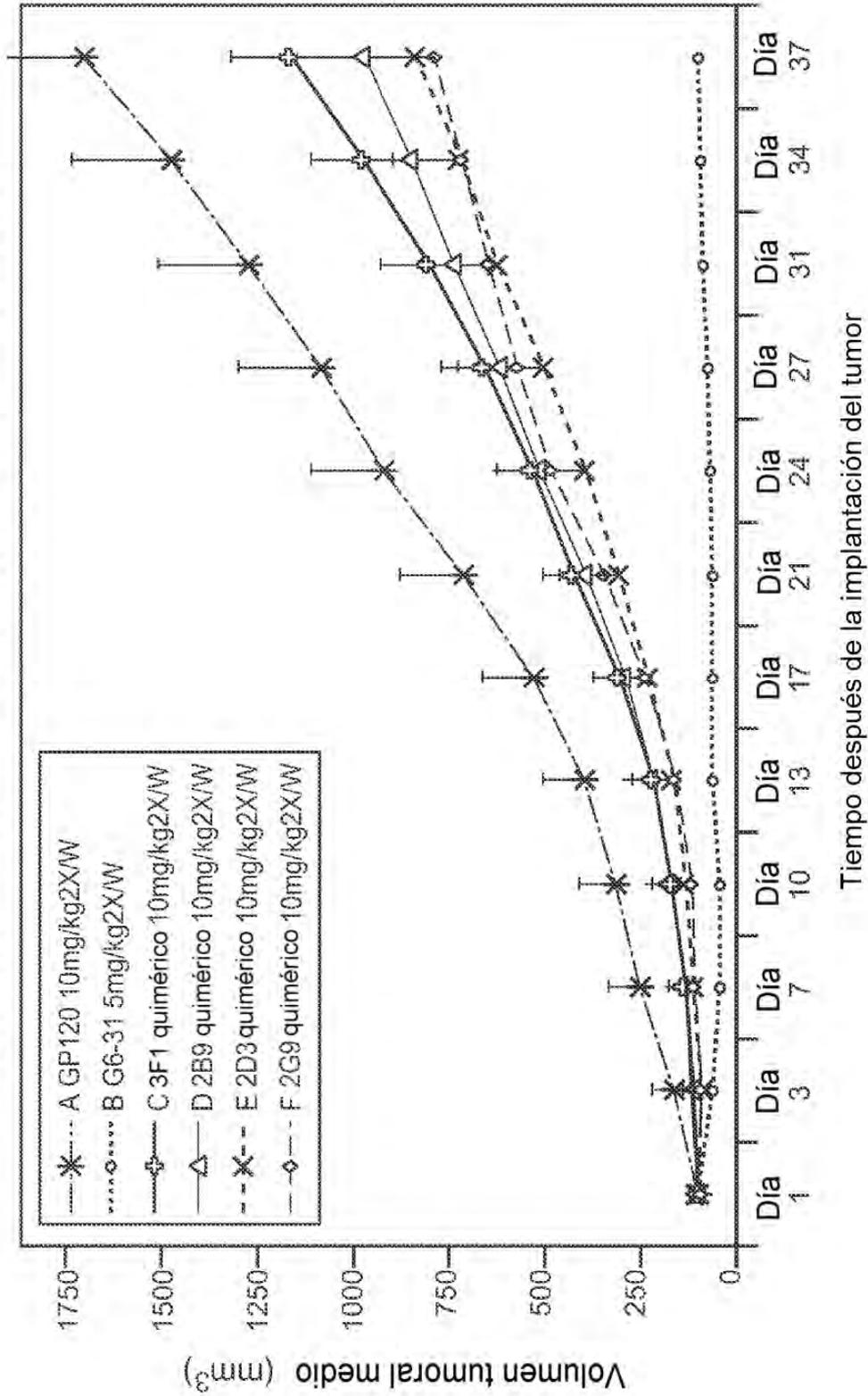
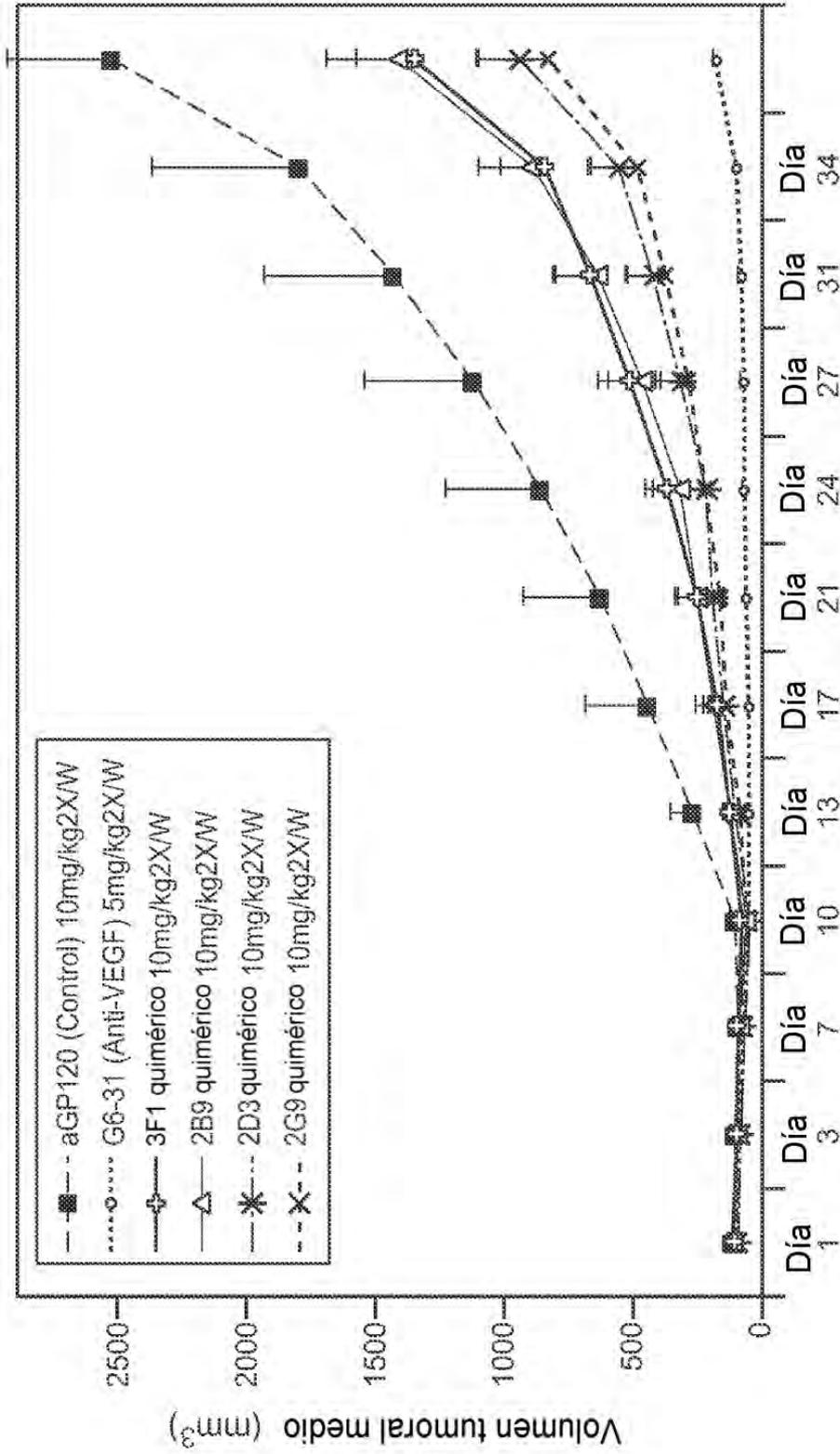


FIG. 27

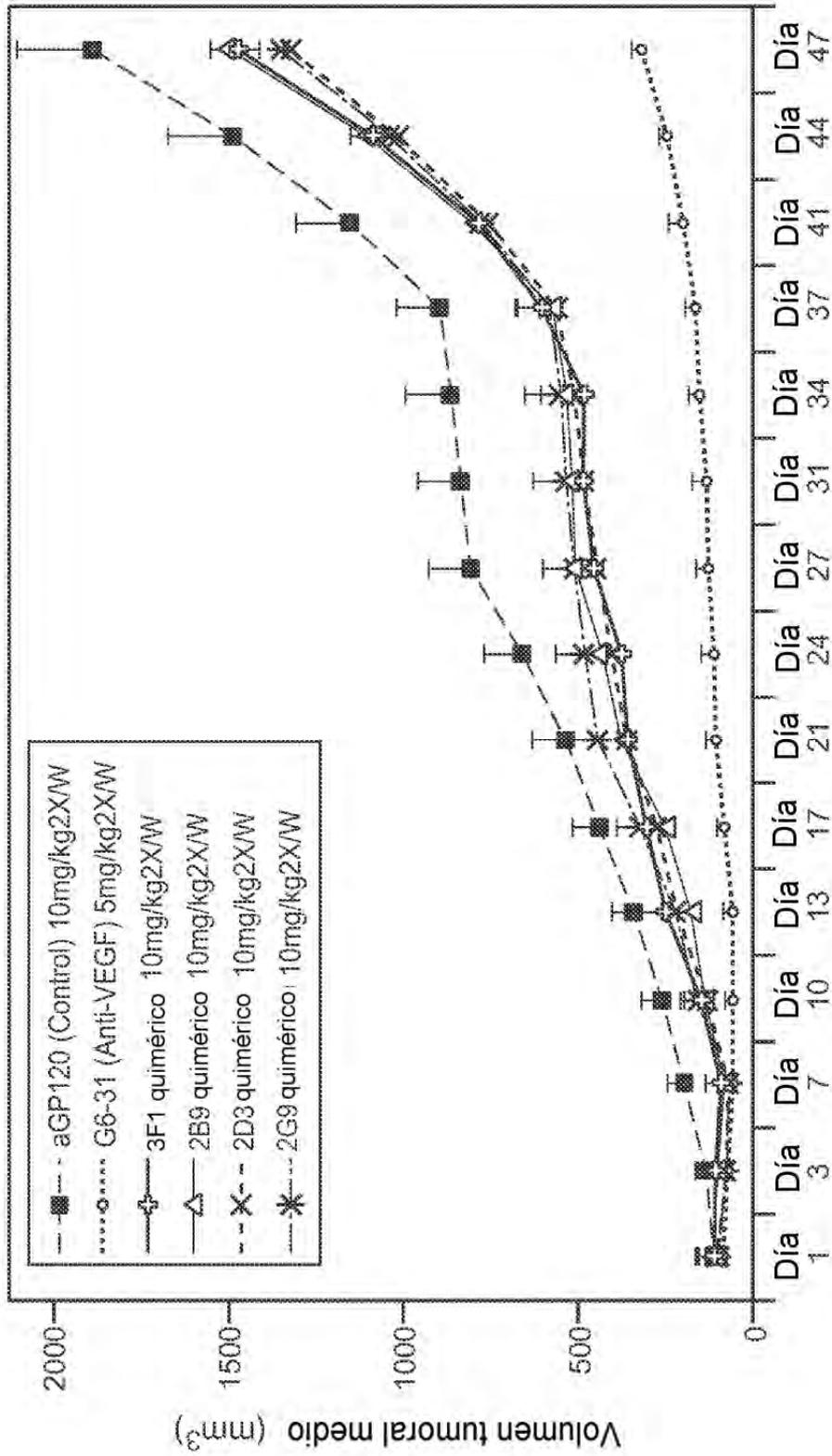
Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, 3F1, 2G9 o 2B9 en cáncer de pulmón humano Calu6 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

FIG. 28

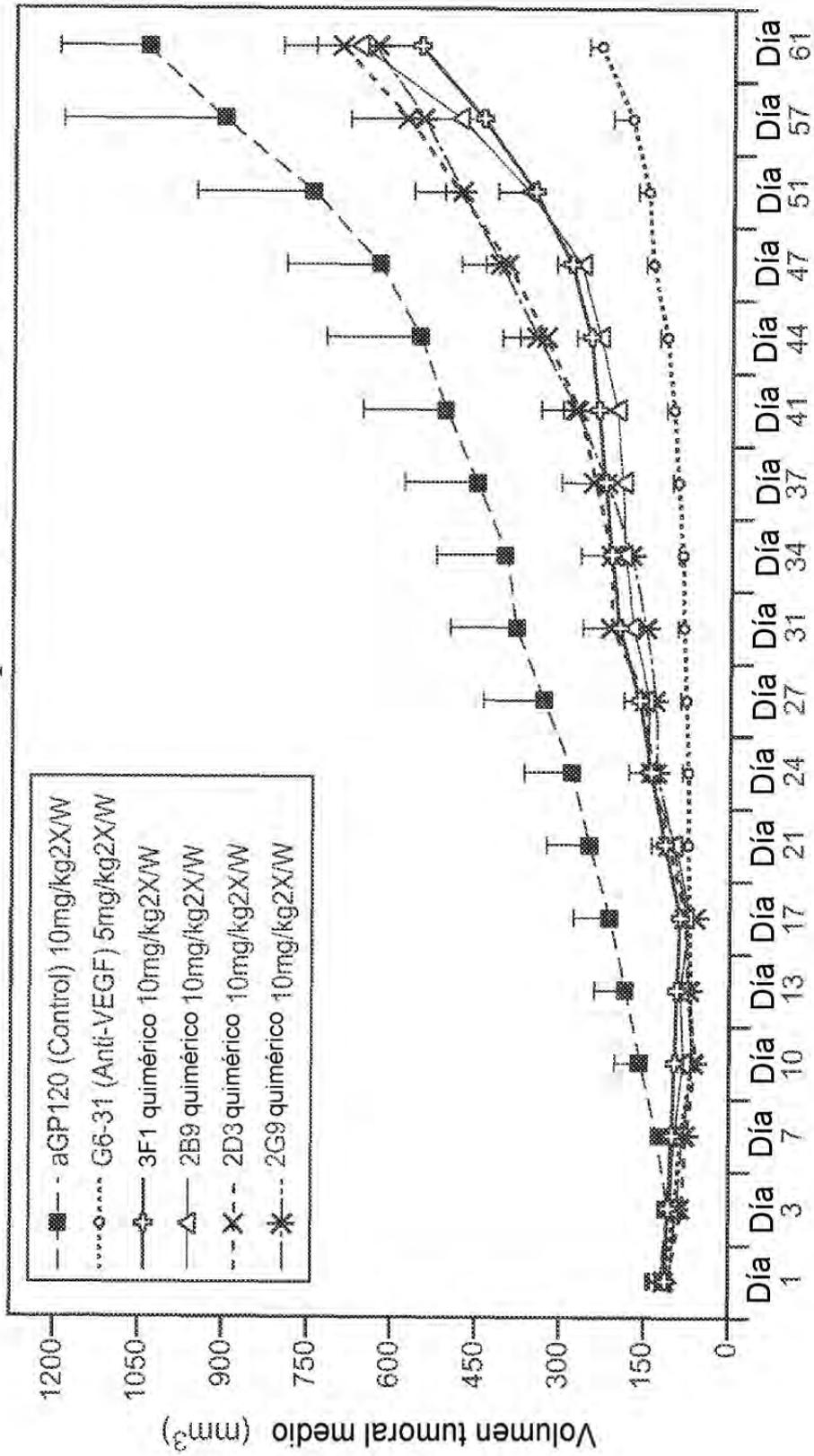
Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, 3F1, 2G9 o 2B9 en cáncer de colon humano Colo205 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

FIG. 29

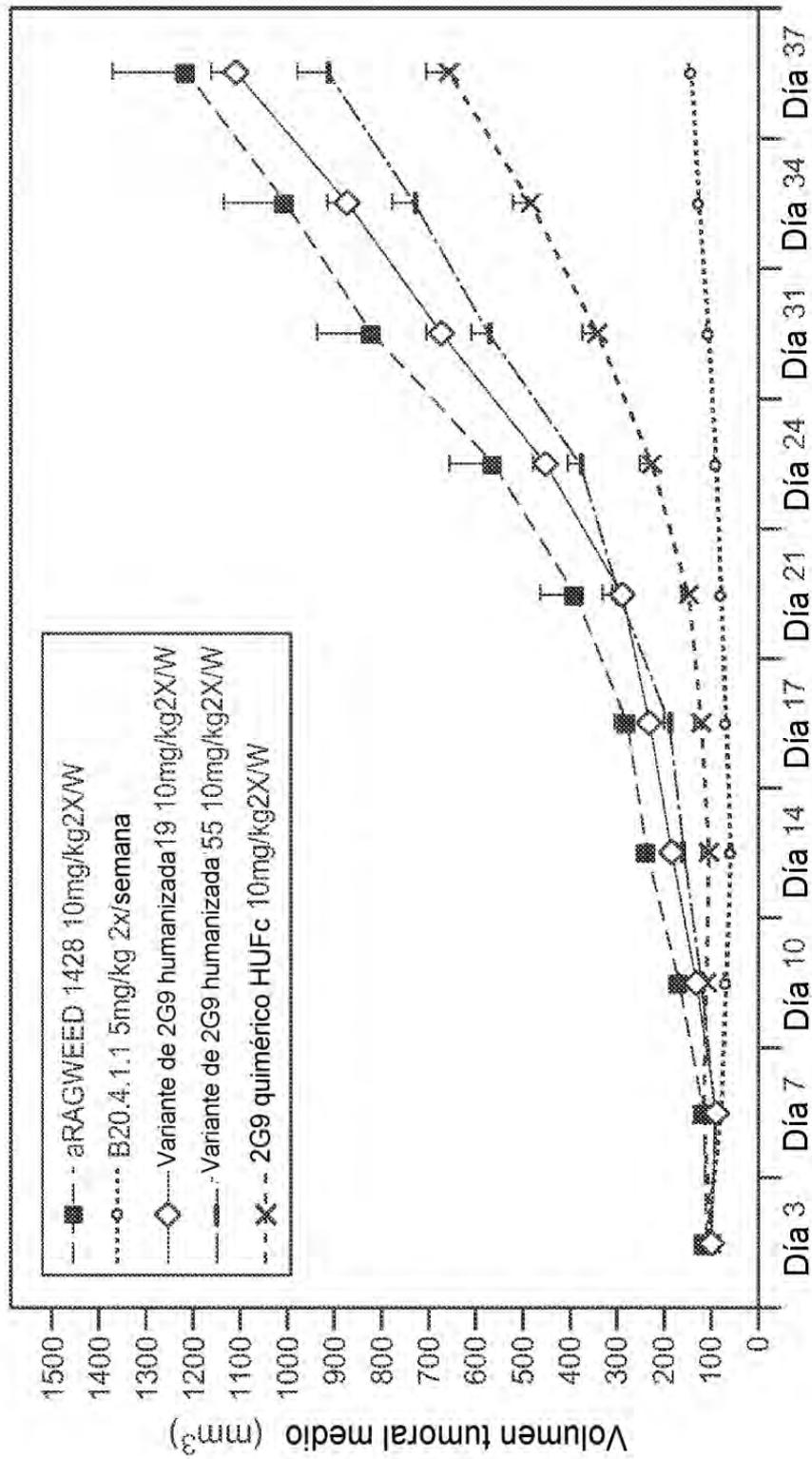
Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, 3F1, 2G9 o 2B9 en cáncer pancreático humano HPAC en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

FIG. 30

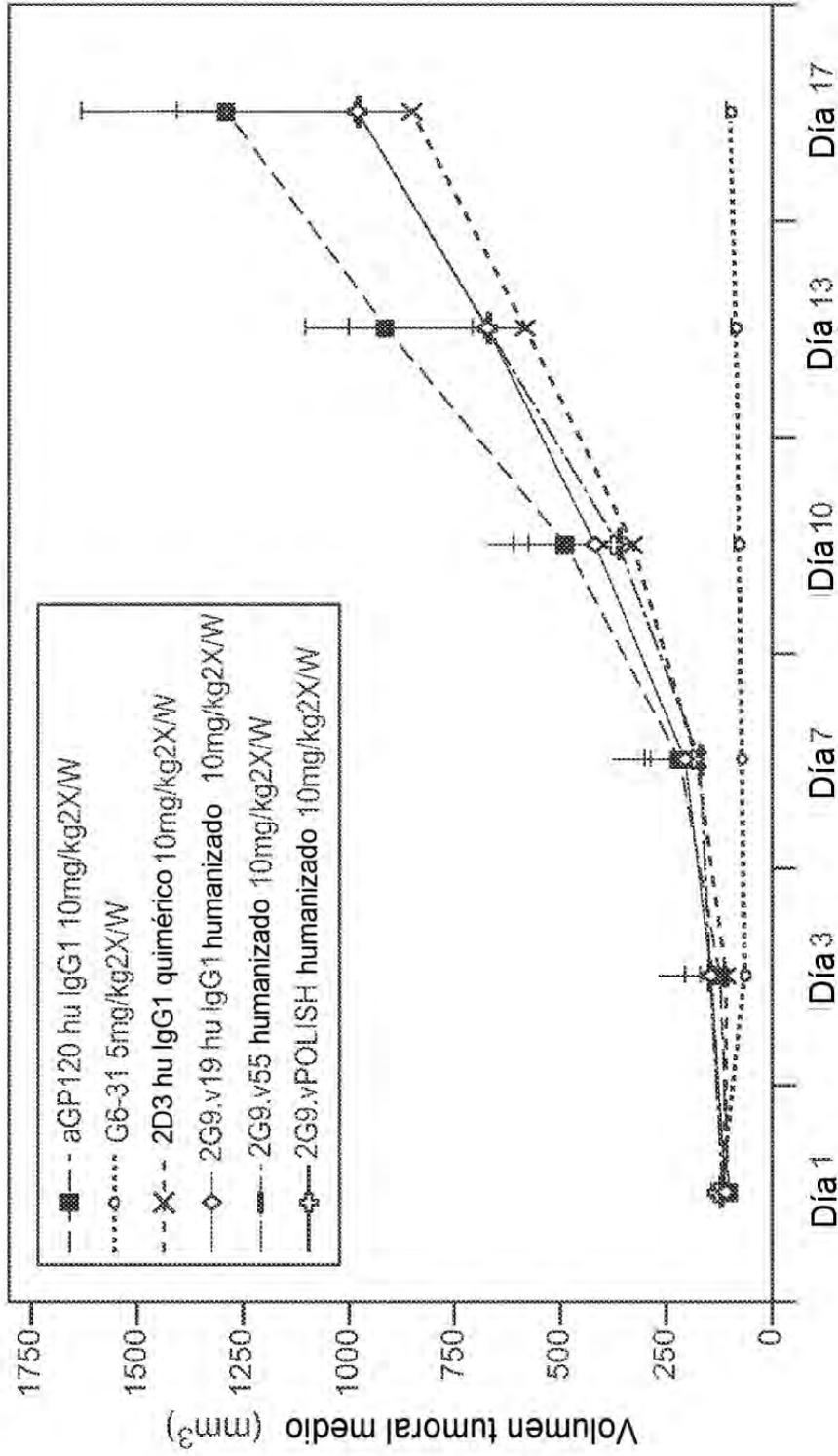
Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2G9 frente a variantes humanizadas 2G9V19, 2G9 V55 en cáncer de pulmón humano Calu6 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

FIG. 31

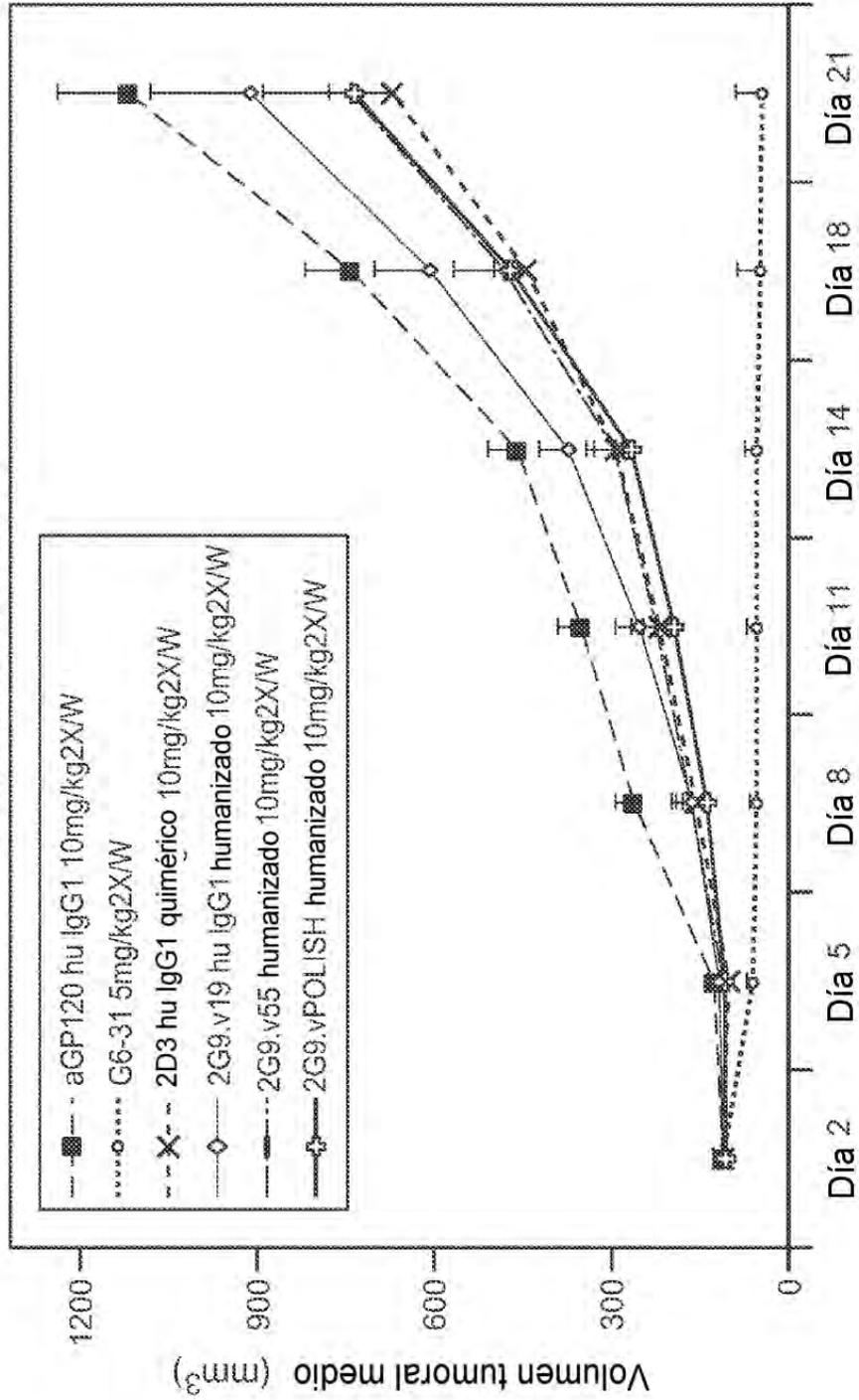
Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, humanizado 2G9.v19, humanizado 2G9.v55 o humanizado 2G9.POLISH en cáncer de colon humano HM7 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

**FIG. 32**

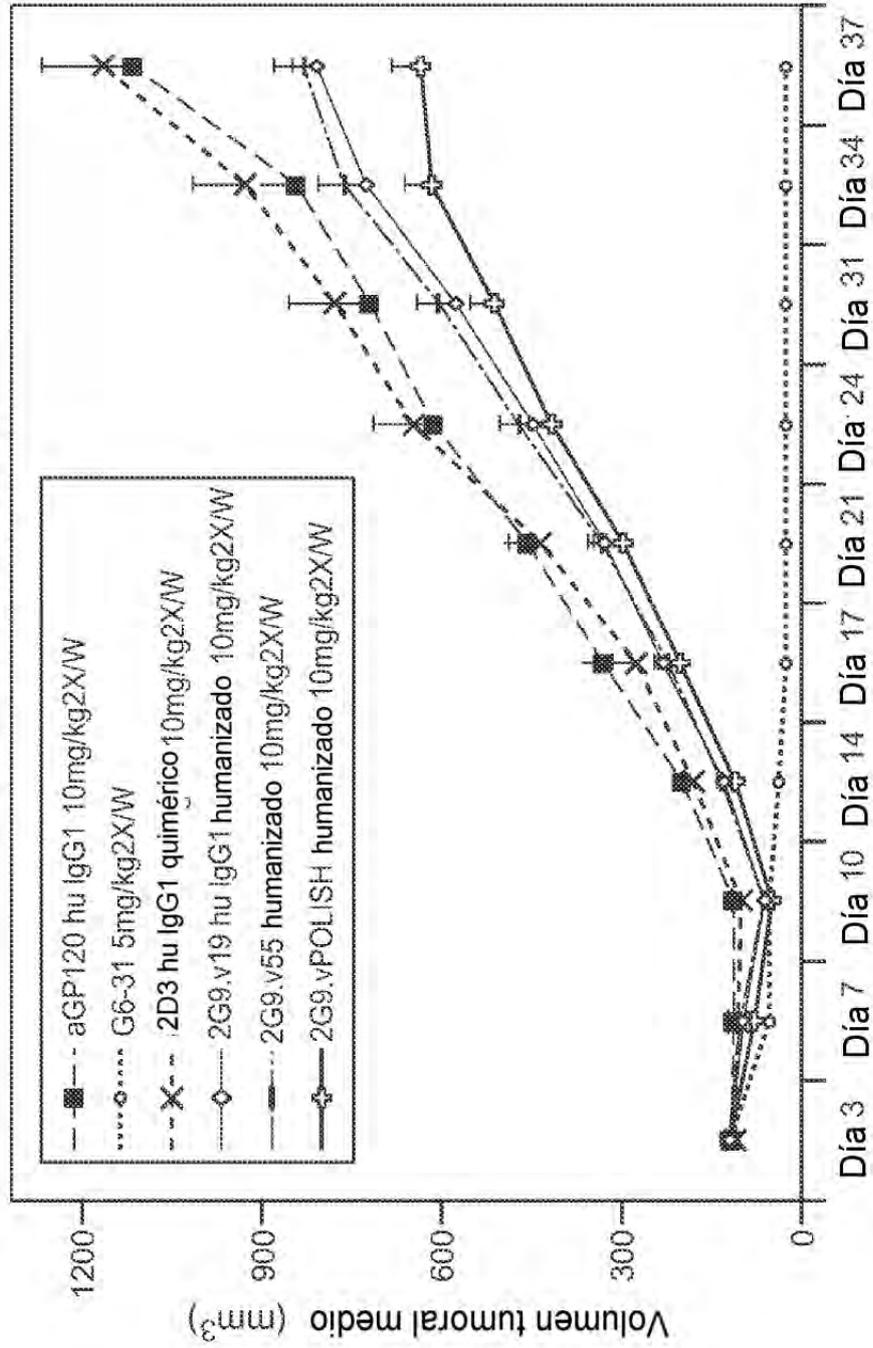
Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, humanizado 2G9.v19, humanizado 2G9.v55 o humanizado 2G9.POLISH en cáncer de rabdomiosarcoma humano A673 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

FIG. 33

Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, humanizado 2G9.v19, humanizado 2G9.v55 o humanizado 2G9.POLISH en cáncer de colon humano HT55 en ratones desnudos Balb-c



Tiempo después de la implantación del tumor

FIG. 34

Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, humanizado 2G9.v19, humanizado 2G9.v55 o humanizado 2G9.POLISH en cáncer de colon humano Colo205 en ratones desnudos Balb-c

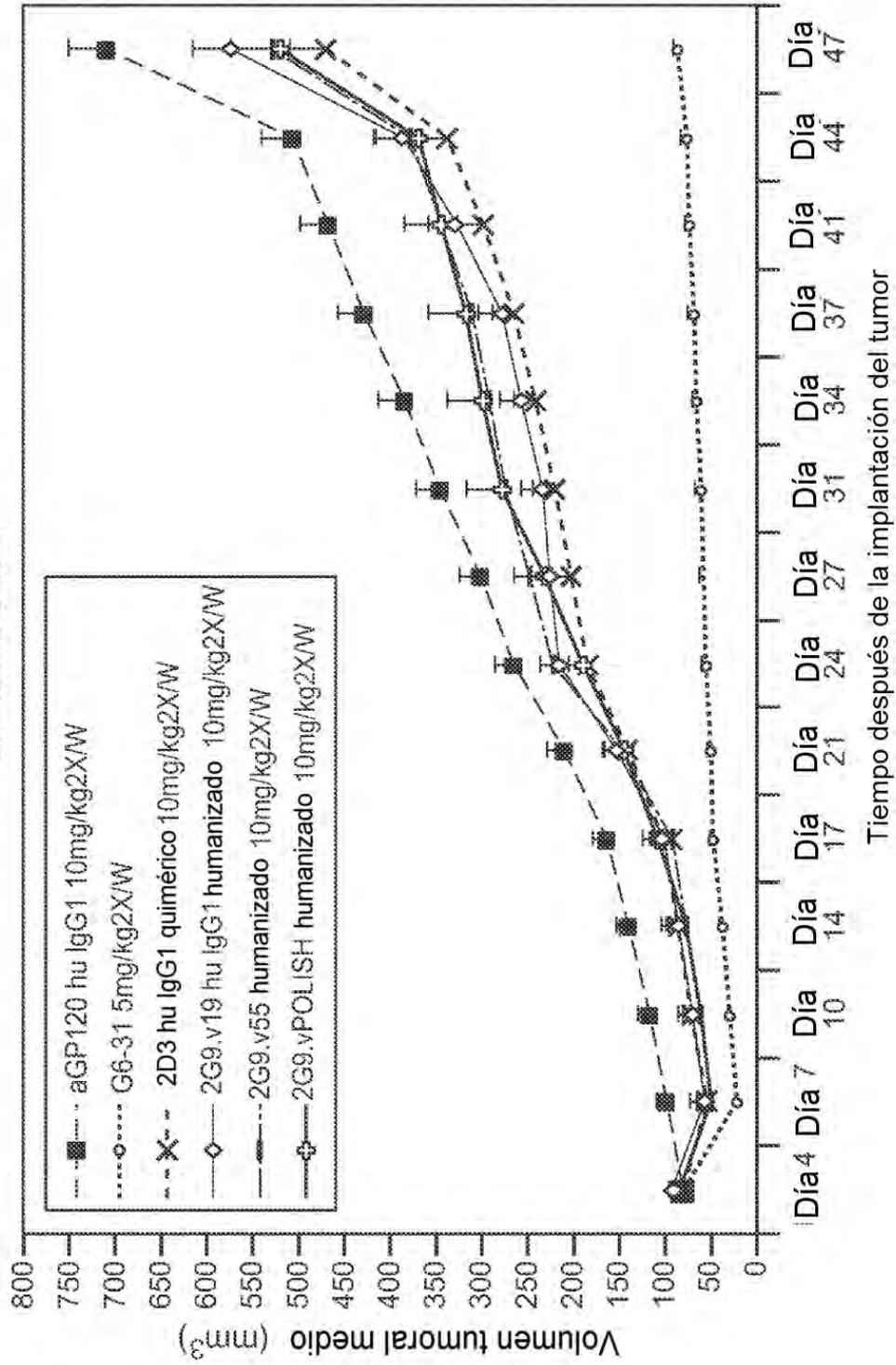


FIG. 35

Comparación de la eficacia de anticuerpos anti-BV8 quiméricos 2D3, humanizado 2G9.v19, humanizado 2G9.v55 o humanizado 2G9.POLISH en cáncer pancreático humano HPAC en ratones desnudos Balb-c

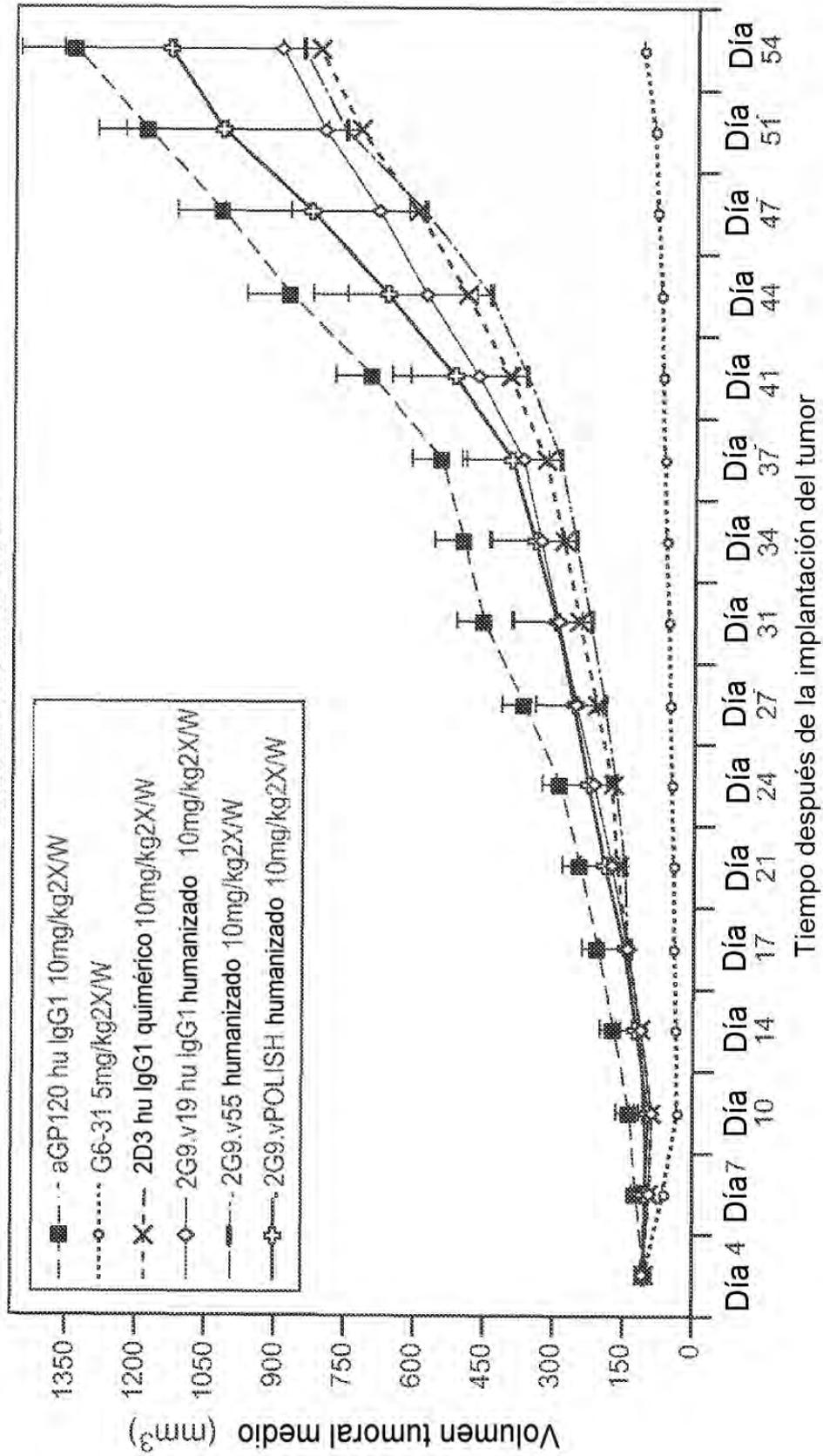
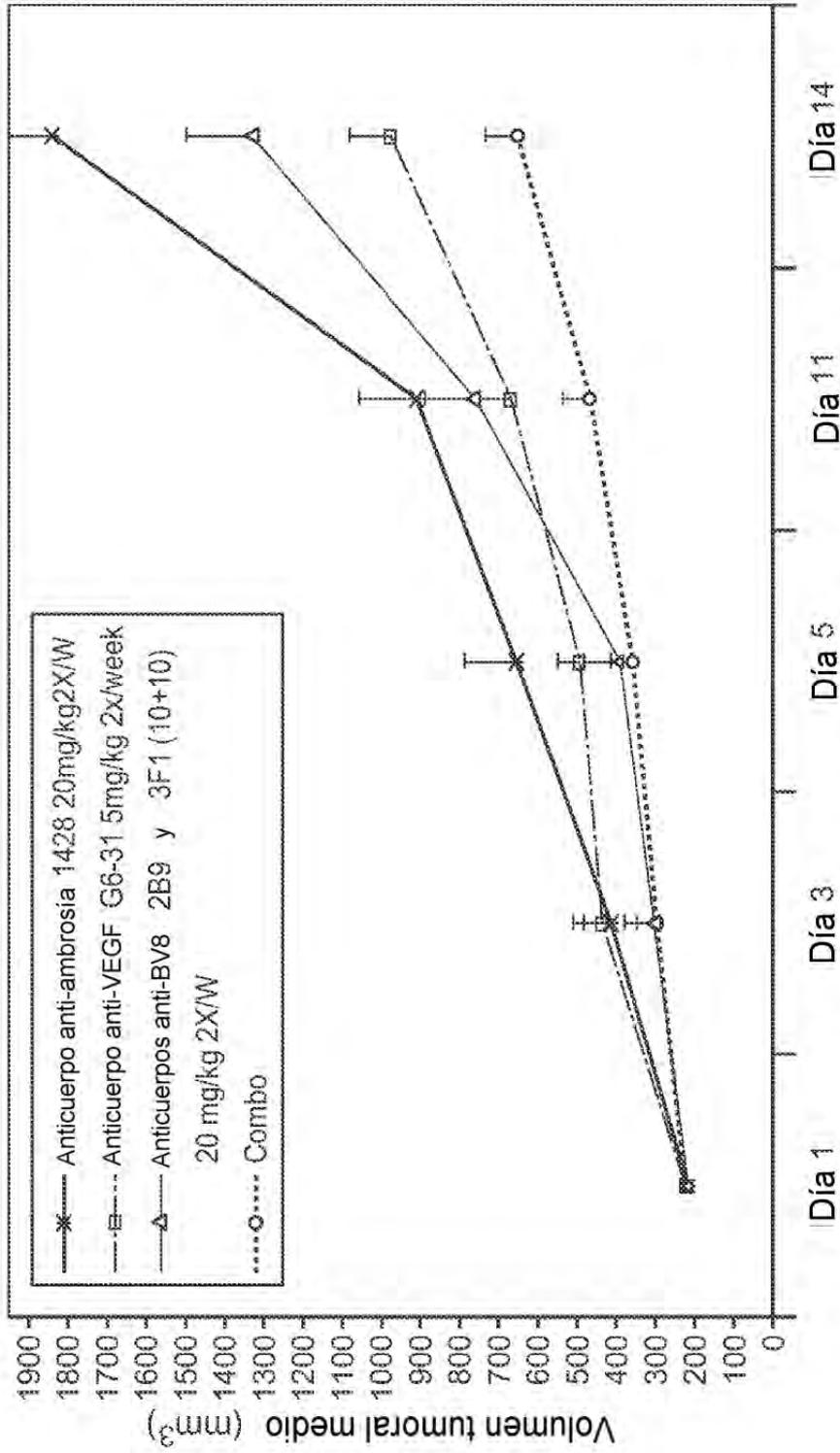


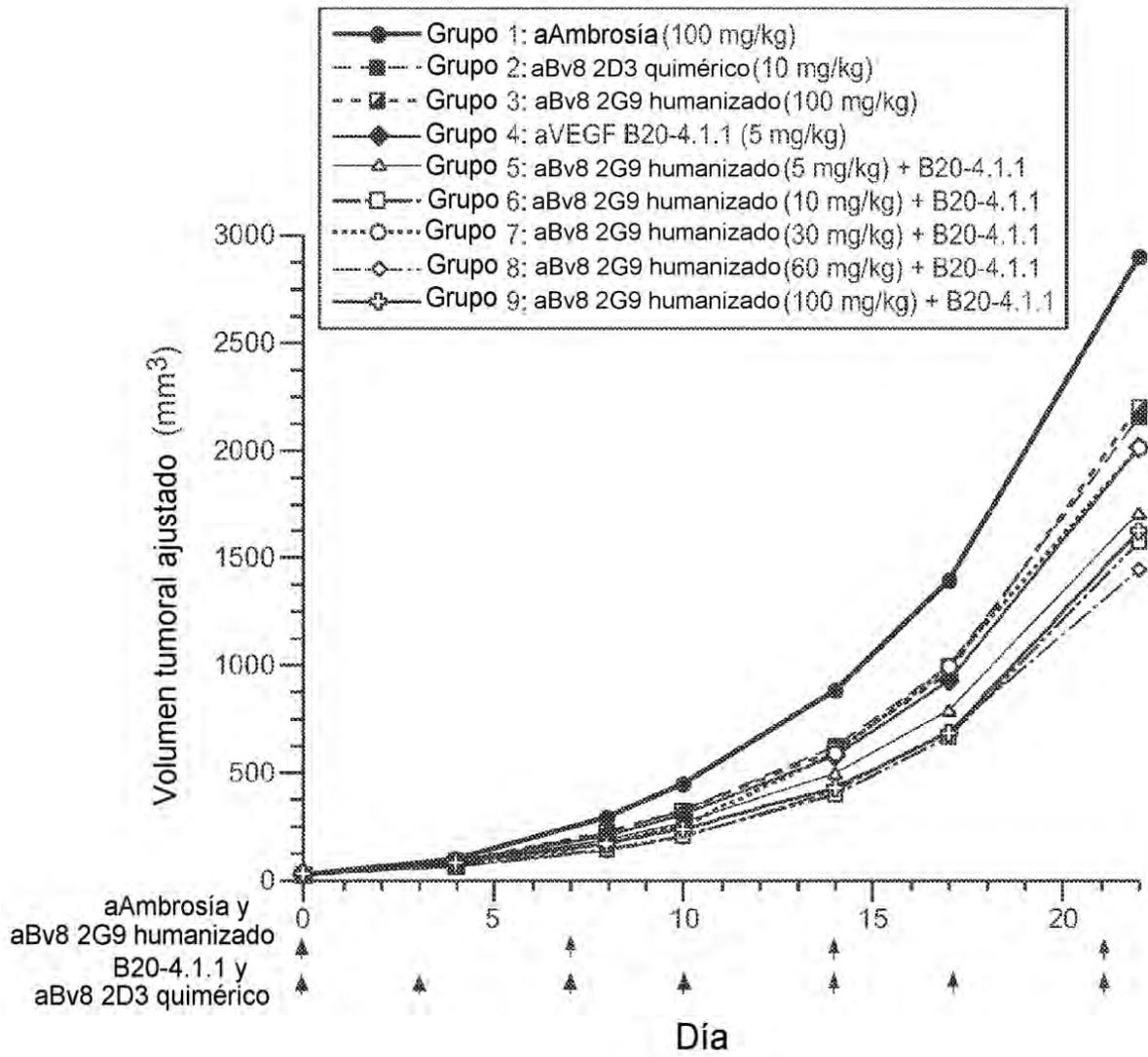
FIG. 36

Los anticuerpos anti-Bv8 tienen efectos aditivos con anti-VEGF en xenoinjertos de carcinoma de pulmón no microcítico humano LXFL529 en ratones desnudos Beige

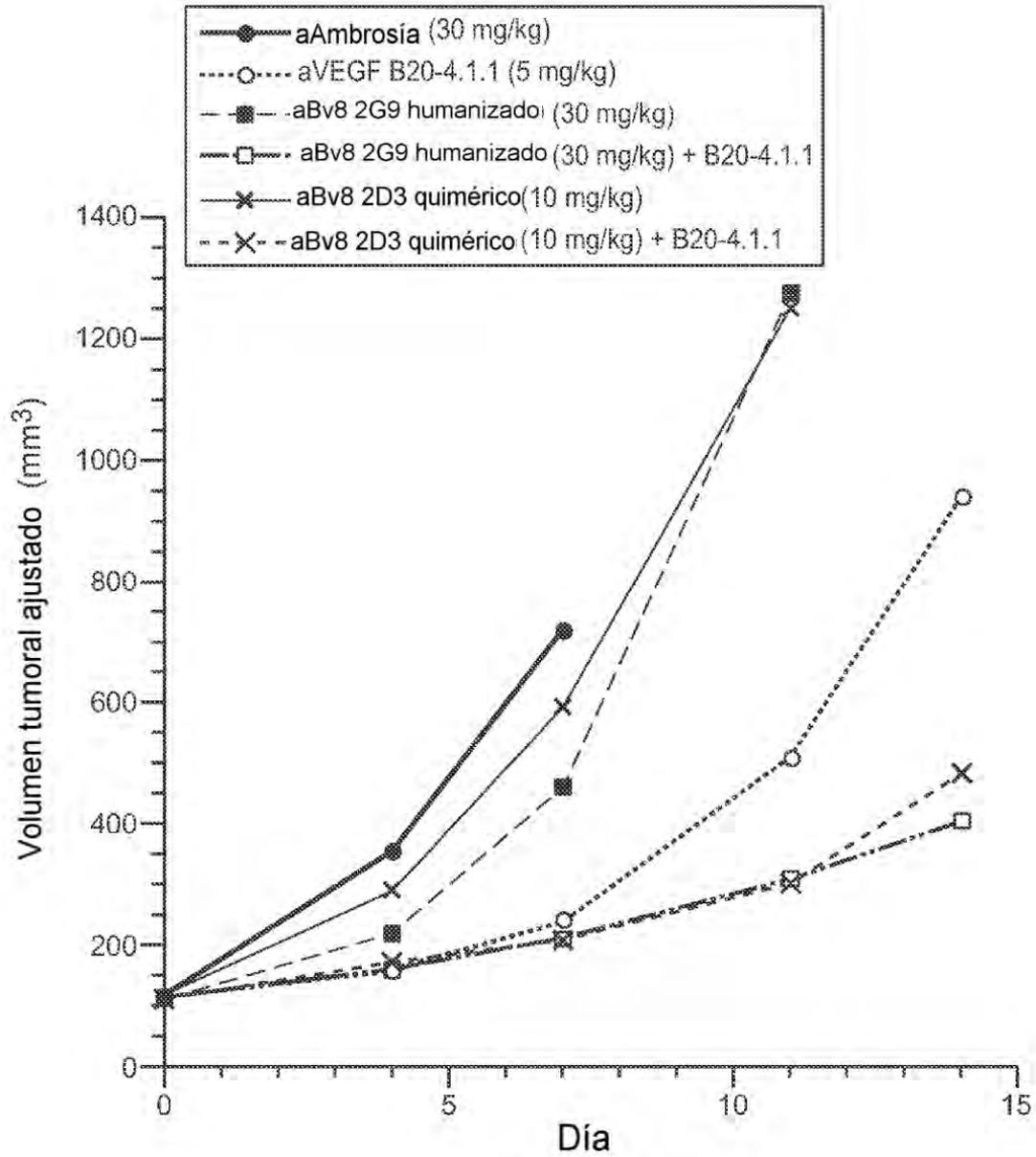


Tiempo después de la implantación del tumor

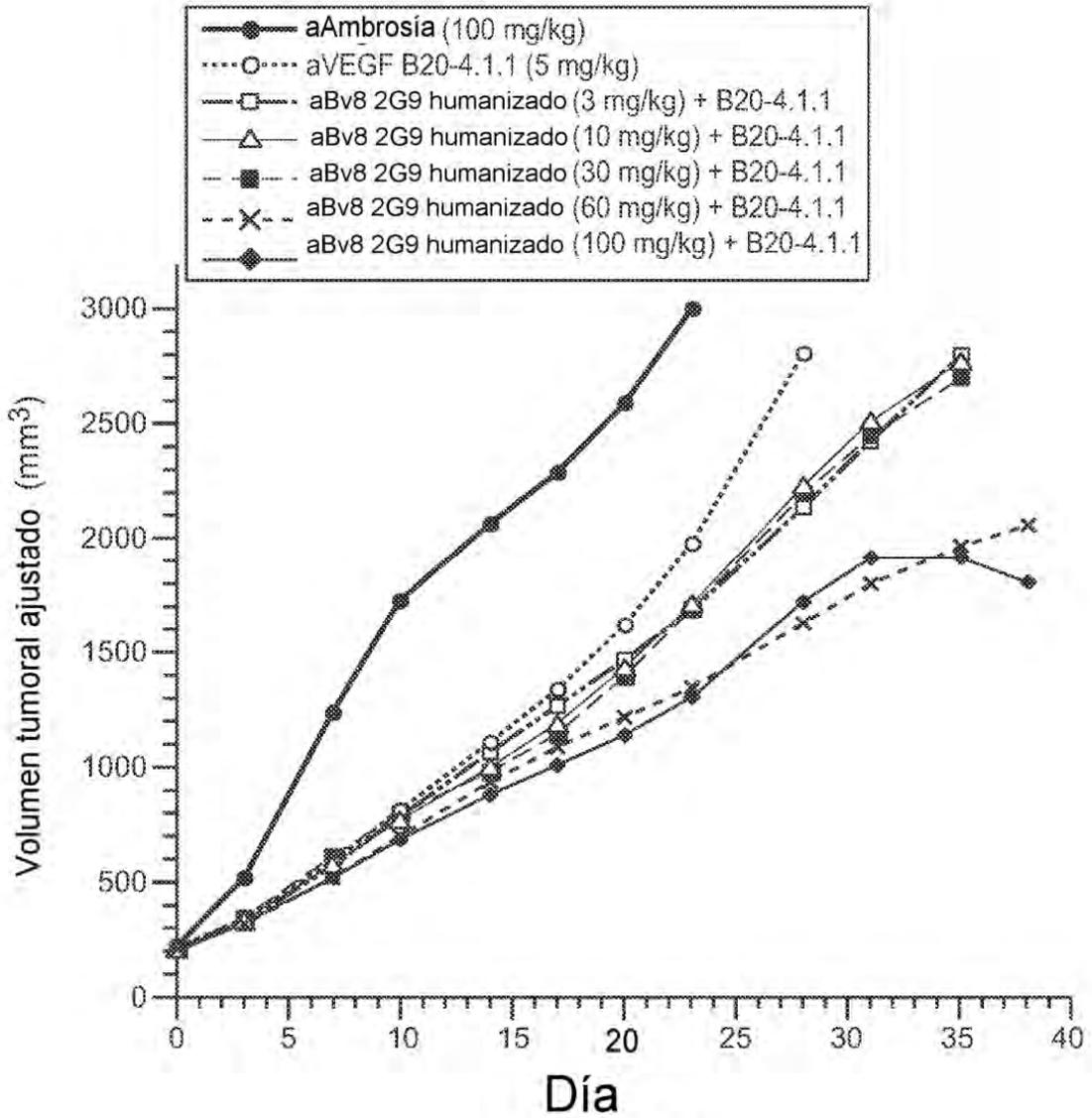
**FIG. 37**



**FIG. 38**



**FIG. 39**



**FIG. 40**

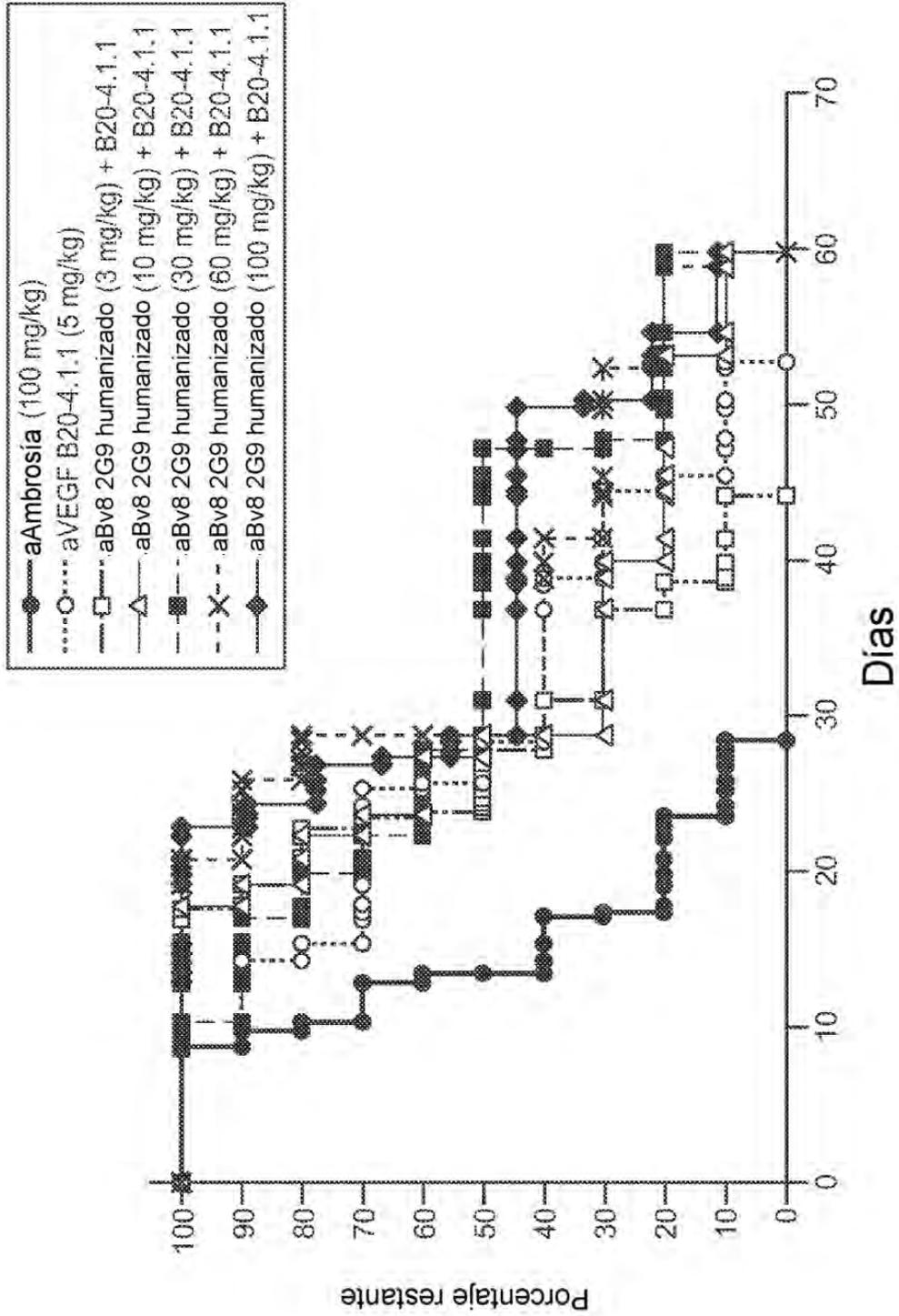
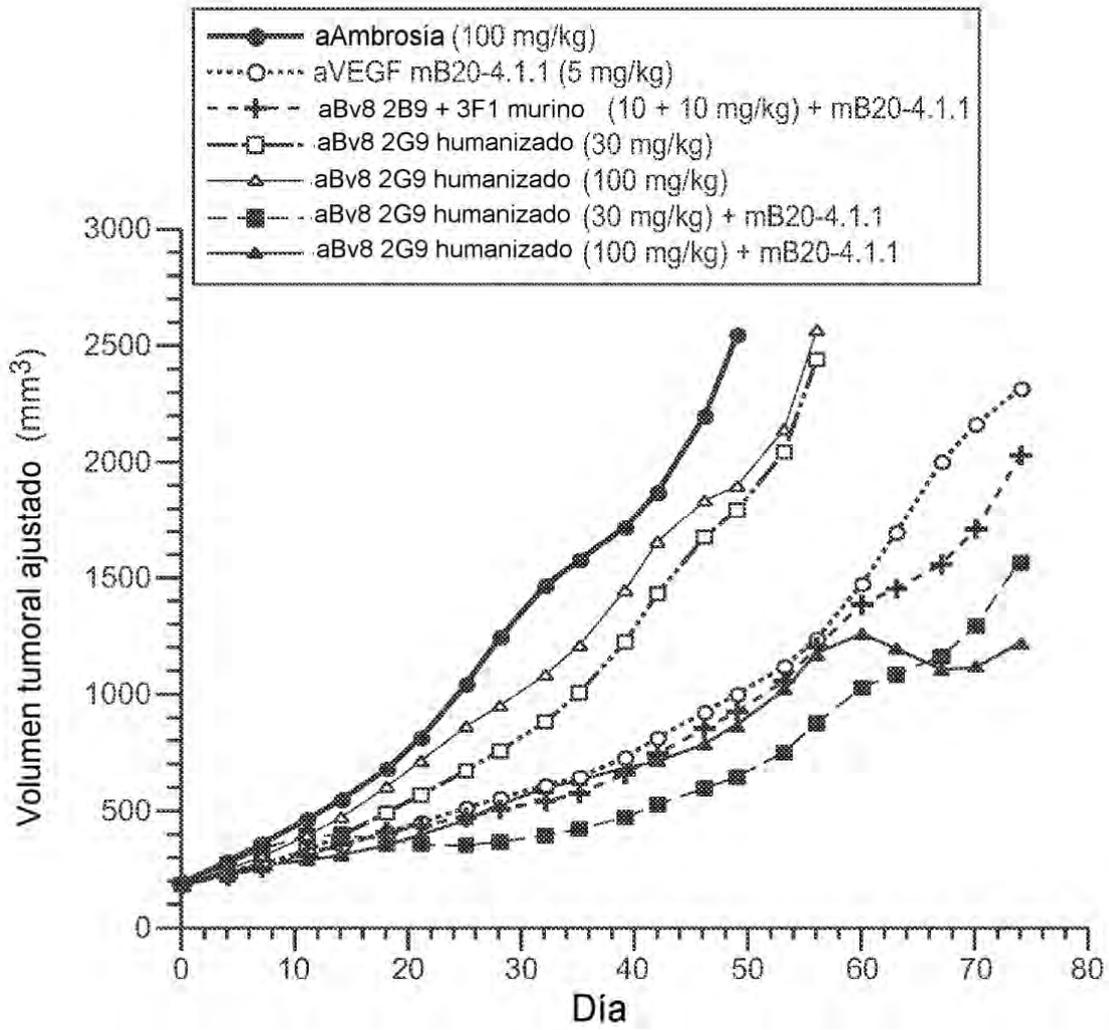


FIG. 41



**FIG. 42**

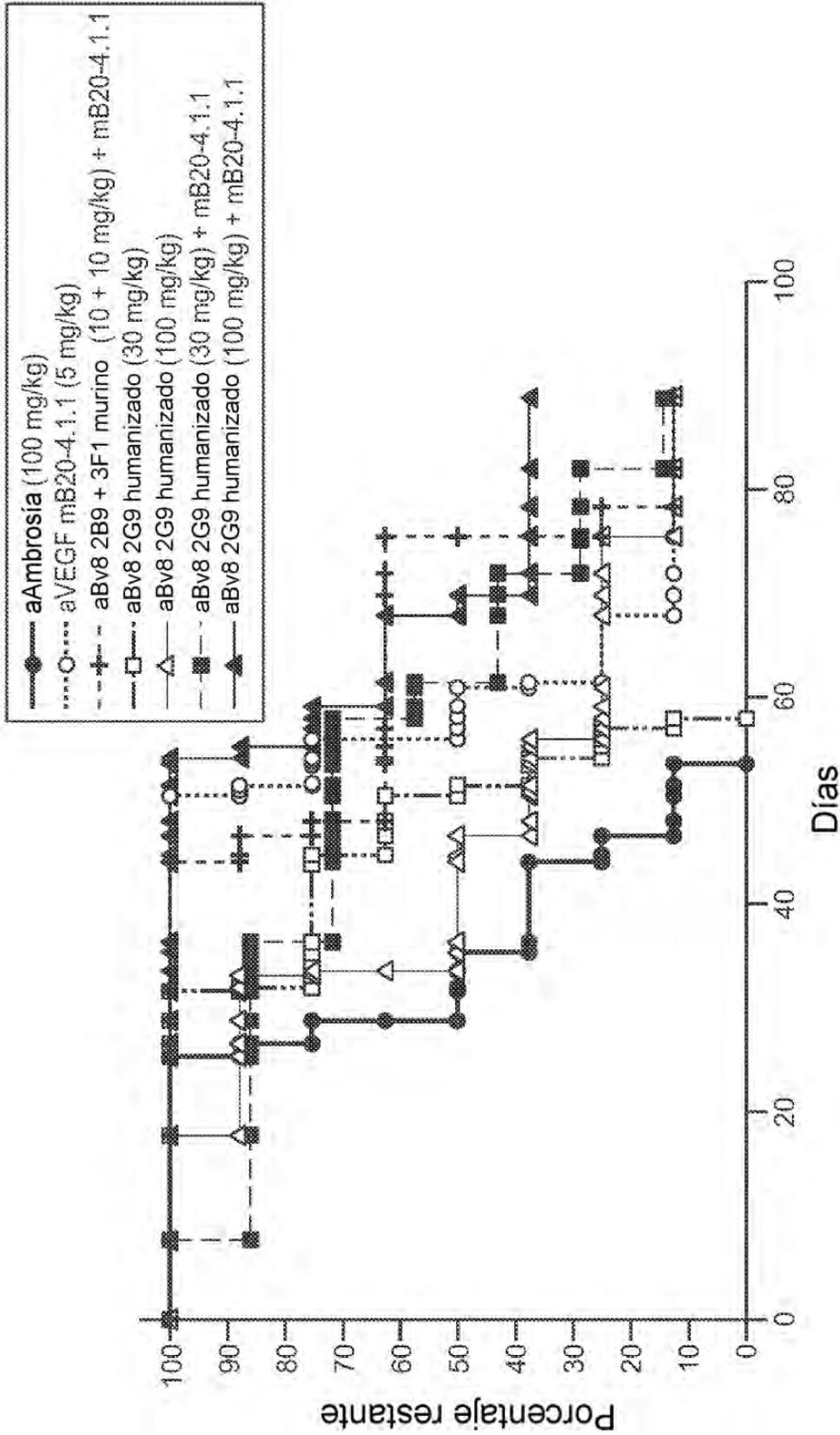


FIG. 43