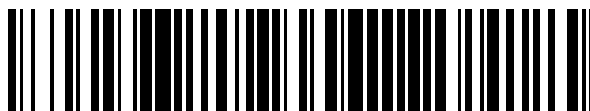


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 497**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2010 PCT/US2010/045651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11022339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2010 E 10810448 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2467156**

54 Título: **Terapia de combinación de cáncer con anticuerpos antiendogлина y agentes anti-VEGF**

30 Prioridad:

17.08.2009 US 234574 P

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

05.03.2018

73 Titular/es:

**TRACON PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
4350 La Jolla Village Drive, Suite 800
San Diego, CA 92122, US y
HEALTH RESEARCH, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**THEUER, CHARLES, P. y
SEON, BEN K.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 657 497 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

Terapia de combinación de cáncer con anticuerpos antiendoglina y agentes anti-VEGF

5 Antecedentes de la invención

10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte en seres humanos después de la enfermedad coronaria. En todo el mundo, millones de personas mueren de cáncer cada año. Solamente en los Estados Unidos, el cáncer causa la muerte de más de medio millón de personas cada año, con unos 1,4 millones de nuevos casos diagnosticados al año. Si bien las muertes causadas por enfermedades cardíacas han disminuido significativamente, las producidas por cáncer generalmente continúan en aumento. Se predice que, a inicios del próximo siglo, el cáncer se convertirá en la causa principal de muerte.

15 Por otra parte, incluso en aquellos pacientes con cáncer que sobreviven inicialmente a sus cánceres primarios, la experiencia común ha demostrado que sus vidas se afectan drásticamente. Muchos pacientes con cáncer experimentan ansiedades intensas impulsadas por la conciencia del potencial de recurrencia o fracaso del tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan una debilidad física significativa después del tratamiento.

20 En sentido general, el problema fundamental en el manejo de los cánceres más mortales es la carencia de terapias sistémicas eficaces y no tóxicas. El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por mutaciones genéticas que conducen al crecimiento celular incontrolado. Las células cancerosas están presentes en todos los organismos y en circunstancias normales su crecimiento excesivo se encuentra estrictamente regulado por varios factores fisiológicos.

25 La angiogénesis es el proceso fisiológico mediante el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Se ha sugerido que la angiogénesis desempeña una función tanto en procesos normales como patológicos. Por ejemplo, los procesos angiogénicos participan en el desarrollo de los sistemas vasculares de los órganos y tejidos animales.

30 En ciertas condiciones patológicas, la angiogénesis se estimula como un medio para proporcionar un suministro adecuado de sangre y nutrientes a las células en el tejido afectado. Muchas de estas condiciones patológicas involucran una proliferación y/o regulación celular aberrantes. Los cánceres sólidos y la degeneración macular exudativa dependen del reclutamiento de un nuevo suministro de sangre para el crecimiento continuo, así como la metástasis.

35 Resumen de la invención

40 La presente invención proporciona un método para inhibir el brote de nuevos vasos inducido por VEGF mediante el contacto de células in vitro con una composición que comprende un anticuerpo antiendoglina quimérico y una composición que comprende un anticuerpo anti-VEGF antagonista; dicho anticuerpo antiendoglina quimérico comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 1; una región constante de cadena ligera (C_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 2; una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 3; y una región constante (F_c) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 4.

45 La presente invención proporciona, además, una composición que comprende un anticuerpo antiendoglina quimérico y una composición que comprende un anticuerpo anti-VEGF antagonista para el uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto; dicho anticuerpo antiendoglina quimérico comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 1; una región constante de cadena ligera (C_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 2; una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 3; y una región constante (F_c) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 4; en donde el tratamiento en dicha enfermedad relacionada con la angiogénesis se caracteriza por la inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF.

55 La composición de la invención puede comprender, además, un portador o excipiente aceptable.

60 La enfermedad relacionada con la angiogénesis puede ser un cáncer, o una metástasis de este. Por lo tanto, la composición puede inhibir el crecimiento canceroso. El cáncer puede ser un tumor sólido, preferentemente, el cáncer es un tumor de base epitelial. El cáncer puede seleccionarse de un cáncer de pulmón, una enfermedad maligna ginecológica, un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un cáncer de ovario, un cáncer uterino, un cáncer colorrectal, un cáncer de próstata, un cáncer de cabeza, un cáncer de hígado (cáncer hepatocelular), un cáncer de cuello, un cáncer de riñón (cáncer de células renales), un sarcoma, un mieloma, y un linfoma.

65 Alternativamente, la enfermedad relacionada con la angiogénesis puede ser una enfermedad ocular caracterizada por angiogénesis/neovascularización. La enfermedad ocular puede ser degeneración macular o retinopatía diabética. La degeneración macular puede ser degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

- El anticuerpo antiendoglina quimérico puede estar presente en la composición de la invención en una cantidad de 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg. El anticuerpo anti-VEGF puede estar presente en la composición de la invención en una cantidad de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg.
- 5 El anticuerpo antiendoglina quimérico y el anticuerpo anti-VEGF pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. El anticuerpo antiendoglina quimérico y el anticuerpo anti-VEGF pueden administrarse en el mismo sitio, o pueden administrarse en sitios diferentes.
- 10 El anticuerpo anti-VEGF puede ser bevacizumab.
- El anticuerpo anti-VEGF puede ser ranibizumab.
- 15 Las composiciones descritas en la presente descripción también pueden contraer los vasos sanguíneos, inhibir la proliferación de células endoteliales asociada con la enfermedad, y/o prevenir las fugas de vasos sanguíneos.
- Las composiciones descritas en la presente descripción pueden usarse para tratar o prevenir la degeneración macular, la CNV, la retinopatía diabética, o la vitreorretinopatía proliferativa. Las composiciones descritas en la presente descripción también pueden contraer los vasos sanguíneos, inhibir la proliferación de células endoteliales asociada con la enfermedad ocular, eliminar los síntomas de hemorragia, tratar la visión nublada, proporcionar detención de la pérdida de visión, y/o prevenir las fugas de vasos sanguíneos.
- 20 En la presente descripción se proporciona un anticuerpo antiendoglina quimérico que tiene una región variable de cadena pesada (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 3; una región constante de cadena pesada (Fc) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 4; una región variable de cadena ligera (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 1; y una región constante de cadena ligera (CL) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 2.
- 25 Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden modificarse para alterar una propiedad farmacocinética del compuesto tal como, por ejemplo, la estabilidad in vivo, la solubilidad, la biodisponibilidad o la vida media. Tales modificaciones, incluyen, pero no se limitan a PEGilación y/o glucosilación.
- 30 Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden formularse para su suministro rápido o prolongado mediante el uso de medios convencionales. El suministro rápido es, por ejemplo, por inyección intravenosa. El suministro prolongado es, por ejemplo, por deposición subcutánea.
- 35 En la presente descripción se describen composiciones de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción y un portador o excipiente aceptable.
- 40 Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos como se describe en la presente descripción pueden usarse para tratar varias enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis, por ejemplo, varias formas de cáncer, tumores sólidos, y metástasis. Además, estos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente descripción pueden usarse en la formulación de un medicamento para la profilaxis, el tratamiento, o el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con varias formas de cáncer, tumores sólidos, y metástasis.
- 45 Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos como se describe en la presente descripción pueden usarse para tratar varias formas de enfermedades oculares o no oculares caracterizadas por angiogénesis/neovascularización (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética). Además, estos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente descripción pueden usarse en la formulación de un medicamento para la profilaxis, el tratamiento, o el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis, por ejemplo, varias formas de enfermedades oculares o no oculares caracterizadas por angiogénesis/neovascularización (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética).
- 50 En la presente descripción se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria del huésped en un paciente, mediante la administración al paciente de una primera composición que contiene un anticuerpo antiendoglina quimérico y una segunda composición que contiene un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión al antígeno de este, mediante lo cual se induce una respuesta inmunitaria eficaz del huésped.
- 55 En la presente descripción se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria del huésped en un paciente, mediante la administración al paciente de una composición que contiene un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión al antígeno de este, mediante lo cual se induce una respuesta inmunitaria eficaz del huésped.
- 60 La respuesta inmunitaria del huésped puede ser una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria mediada por células. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta que inhibe la angiogénesis, una enfermedad
- 65

dependiente de la angiogénesis o un trastorno dependiente de la angiogénesis. Las respuestas inmunitarias incluyen, además, la inducción o el bloqueo de vías de señalización celular (por ejemplo, la señalización de Smad).

5 En la presente descripción se describe un método para afectar las vías de señalización celular asociadas con la angiogénesis. Las células angiogénicas pueden ponerse en contacto (*in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*) con una o más composiciones descritas en la presente descripción en una cantidad suficiente para alterar las vías de señalización celular. En un ejemplo, en respuesta a la unión del anticuerpo antiendoglina quimérico, la señalización de Smad 1, 5 y/u 8 se inhibe en aproximadamente 1,5 veces o más en células angiogénicas. En otro ejemplo, los niveles de Smad 3 aumentan en aproximadamente 1,5 veces o más, lo que indica que las células regresan a un estado inactivo. Una
10 composición que contiene un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión al antígeno de este se administra, además, junto con una composición que contiene un anticuerpo antiendoglina quimérico.

15 En una modalidad, la inhibición de la angiogénesis o una enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis alivia los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno. En otra modalidad, la inhibición de la angiogénesis o una enfermedad o trastorno dependiente de la angiogénesis da lugar a la disminución del tamaño tumoral, la prevención de la progresión del tumor, la disminución de la proliferación celular, el aumento de la apoptosis, o el aumento de la supervivencia de un sujeto.

20 La administración de las composiciones de la invención puede prolongar la vida del sujeto tratado. Un cáncer/tumor a tratar incluye un tumor sólido; un tumor puede ser un tumor primario o un tumor metastásico. Los tumores sólidos ilustrativos son de un tejido u órgano seleccionado de piel, melanoma, pulmón, páncreas, mama, ovario, colon, recto, estómago, tiroides, laringeo, ovárico, próstata, colorrectal, cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, pecho, hueso, testicular, linfóide, médula, hueso, sarcoma, renal, glándula sudorípara, hígado, riñón, cerebro, por ejemplo, glioblastoma multiforme y los tejidos similares. En un ejemplo no limitante un tumor sólido es un tumor de colon, un
25 tumor de mama, un tumor de riñón, un tumor de pulmón, un tumor de próstata, un tumor de ovario, o metástasis de cualquiera de dichos tumores.

30 Un tejido ocular a tratar es, por ejemplo, un tejido retinal de un paciente con retinopatía diabética, degeneración macular o glaucoma neovascular y la angiogénesis a inhibir es angiogénesis de tejido retinal donde existe neovascularización del tejido retinal.

35 Los tratamientos descritos pueden incluir, además, la eliminación quirúrgica de un tumor y/o la administración de uno o más agentes anticancerígenos. Un agente anticancerígeno adicional puede administrarse antes de, junto con, o posterior a, la administración de las composiciones descritas en la presente descripción. Un agente anticancerígeno adicional puede administrarse dentro de una semana antes que las composiciones, dentro de una semana después que las composiciones, o el agente anticancerígeno adicional puede administrarse en el mismo día que las composiciones. Si un agente anticancerígeno adicional se administra en el mismo día que las composiciones, la administración puede ser simultánea.

40 En la presente descripción se describen métodos para inhibir la angiogénesis mediante el contacto de una célula o tejido con una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más composiciones como se describe en la presente descripción suficiente para inhibir la angiogénesis. En la presente descripción se describen métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales mediante el contacto de células tumorales con o la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más composiciones como se describe en la presente descripción suficiente para
45 inhibir el crecimiento de las células tumorales.

50 En la presente descripción se describe un método, que comprende poner en contacto un tejido con una o más composiciones como se describe en la presente descripción, en donde el contacto inhibe la angiogénesis, el crecimiento celular, la proliferación, la división celular, etc. El tejido puede ser una muestra de biopsia de tejido cultivada o puede estar presente en un sujeto.

55 En la presente descripción se describe un método para prevenir o tratar un trastorno proliferativo celular mediante la administración a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno proliferativo celular una cantidad eficaz de una o más composiciones proporcionadas en la presente descripción eficaces para tratar el trastorno proliferativo celular. El trastorno proliferativo celular puede ser, por ejemplo, un tumor sólido o no sólido benigno o maligno y el tumor puede ser metastásico o no metastásico. El tratamiento puede dar lugar a la mejoría de la afección del sujeto y puede evaluarse mediante la determinación de si uno o más de los factores siguientes se ha producido: disminución de la proliferación celular, disminución de las cantidades de células, aumento de la apoptosis, o disminución de la supervivencia de al menos una porción de las células que comprenden el trastorno proliferativo celular. Uno o más de
60 estos eventos puede dar lugar, en algunos casos, a la eliminación parcial o total de un tumor o metástasis y la prolongación de la supervivencia del paciente.

65 En la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento de la retinopatía diabética, la degeneración macular, la neovascularización coroidal o el glaucoma neovascular en un paciente. El tratamiento puede dar lugar a la mejoría de la afección del sujeto y puede evaluarse mediante la determinación de si uno o más de los

factores siguientes se ha producido: disminución de edema macular, disminución de áreas de CNV, o aumento de la agudeza visual.

5 En los usos que se proporcionan en la presente descripción, un sujeto a tratar puede ser un sujeto humano o no humano. Las composiciones y el agente anticancerígeno o los tratamientos proporcionados en la presente descripción pueden administrarse una vez o múltiples veces en dependencia de la salud del paciente, la progresión de la enfermedad o afección, y la eficacia del tratamiento. Los ajustes a la terapia y los tratamientos pueden realizarse en el transcurso del tratamiento (por ejemplo, la dosis de un anticuerpo en una composición).

10 Las composiciones pueden administrarse localmente, regionalmente o sistémicamente, tal como, por ejemplo, administración por inyección subcutánea, subcutánea, intravítrea, intradérmica, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o intramuscular.

15 Además, los anticuerpos antiendoglina quiméricos también pueden usarse en combinación con otras terapias conocidas y/o anticuerpos anti-VEGF que inhiben la vía de VEGF. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib.

20 Además, los anticuerpos antiendoglina quiméricos y los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente descripción también pueden usarse en combinación con otras terapias y/o compuestos conocidos para el tratamiento de un cáncer. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib. Los ejemplos de otras terapias incluyen, pero no se limitan a, irradiación, cirugía o administración de uno o más agentes quimioterapéuticos.

25 En la presente descripción se proporciona un método para monitorear la eficacia de uno o más de cualquiera de los métodos proporcionados en la presente descripción. El aumento de los niveles de endoglina soluble se ha correlacionado con la disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer. Por lo tanto, los niveles de endoglina soluble pueden monitorearse antes y durante la terapia. Una disminución de los niveles de endoglina soluble puede ser, por lo tanto, una indicación de que un régimen terapéutico es eficaz en el tratamiento del paciente.

30 Una modalidad de la presente solicitud contempla el uso de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción para formular un medicamento para tratar un trastorno descrito en la presente descripción. Los medicamentos pueden formularse en base a las características físicas del paciente/sujeto que necesita tratamiento, y pueden formularse en forma de formulaciones únicas o múltiples en base al estadio de, por ejemplo, el tejido canceroso. Los medicamentos pueden envasarse en un envase adecuado con etiquetas apropiadas para la distribución a hospitales y clínicas en donde la etiqueta es para la indicación de tratar un trastorno como se describe en la presente descripción en un sujeto. Los medicamentos pueden envasarse como unidades individuales o múltiples. Las instrucciones para la dosis y administración de las composiciones descritas en la presente descripción pueden incluirse con los envases.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 proporciona un diagrama de la vía de señalización de TGF- β /ALK5. La vía de TGF- β /ALK5 (A) conduce a la inhibición de la proliferación celular. La vía de TGF- β /ALK1 (B) induce la proliferación de células endoteliales y requiere de CD105 (endoglina) para la señalización de ALK1. Las líneas de puntos indican vías inactivas o bloqueadas. La flecha negrita indica la estimulación de una vía de señalización.

50 La Figura 2 proporciona las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo antiendoglina quimérico (TRC105) descrito en la presente descripción. La Figura 2A es una cadena ligera variable representativa de un anticuerpo antiendoglina quimérico (sec. con núm. de ident.: 1); la Figura 2B es una cadena ligera constante representativa de un anticuerpo antiendoglina quimérico (sec. con núm. de ident.: 2); la Figura 2C es una cadena pesada variable representativa de un anticuerpo antiendoglina quimérico (sec. con núm. de ident.: 3); y la Figura 2D es una cadena pesada constante gamma 1 representativa de un anticuerpo antiendoglina quimérico (sec. con núm. de ident.: 4).

55 La Figura 3 ilustra que mediante el uso de esferoides de HUVEC sembradas en colágeno, TRC105 inhibe el brote de nuevos vasos inducido por VEGF en una manera dependiente de la dosis (N=3).

60 La Figura 4 ilustra que si bien TRC105 bloquea el brote de nuevos vasos inducido por VEGF (rayas diagonales), no inhibe el brote de nuevos vasos inducido por bFGF (relleno de rombos) de esferoides de HUVEC (N=2).

La Figura 5 ilustra que el efecto inhibitorio de TRC105 sobre el brote de nuevos vasos inducido por VEGF (rayas diagonales), aumenta cuando se combina con el inhibidor de VEGF Bevacizumab (relleno de rombos), de manera que el brote de nuevos vasos de HUVEC se inhibe completamente.

65

La Figura 6 ilustra que el efecto inhibitor de TRC105 sobre el brote de nuevos vasos inducido por VEGF (rayas diagonales), no aumenta cuando se combina con un inhibidor de la quinasa del receptor de VEGF (relleno de rombos).

Descripción detallada de la invención

Se debe entender que esta solicitud no se limita a formulaciones o parámetros de proceso particulares, ya que estos, por supuesto, pueden variar. Se debe también entender que la terminología usada en la presente descripción es para propósitos de describir las modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitativa. Además, se entiende que una serie de métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica de las presentes invenciones.

De acuerdo con la presente solicitud, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, y ADN recombinante como se explica completamente en la técnica.

Los anticuerpos antiendoglina quiméricos pueden usarse en combinación con agentes anti-vegf para tratar o prevenir varias formas de cáncer, tumores sólidos, y metástasis y similares. En la presente descripción se describen métodos para tratar varias formas de cáncer, tumores sólidos, y metástasis y similares por medio de la administración de las composiciones descritas en la presente descripción. Las composiciones descritas en la presente descripción también pueden contraer los vasos sanguíneos, inhibir la proliferación de células endoteliales asociada con la enfermedad, y/o prevenir las fugas de vasos sanguíneos.

Terminología de anticuerpos

Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina (Ig) ya sea natural o producida de forma parcial o completamente sintética. El término abarca, además, cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es homólogo a, un dominio de unión al antígeno. El término incluye, además, "fragmentos de unión al antígeno" y otros términos usados indistintamente para fragmentos de unión similares tal como se describe más abajo. Los anticuerpos quiméricos también se contemplan en este término.

Usualmente los anticuerpos nativos y las inmunoglobulinas nativas son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une típicamente a una cadena pesada por un enlace covalente disulfuro, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene, además, puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene un dominio variable ("V_H" o "VH") en un extremo seguido de una serie de dominios constantes ("C_H" o "CH"). Cada cadena ligera tiene un dominio variable ("V_L" o "VL") en un extremo y un dominio constante ("C_L" o "CL") en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se encuentra alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se encuentra alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

Los términos "polinucleótido sintético," "gen sintético" o "polipéptido sintético," como se usa en la presente descripción, significan que la secuencia de polinucleótido correspondiente o porción de esta, o la secuencia de aminoácidos o porción de esta, se deriva, de una secuencia que se ha diseñado, o sintetizado *de novo*, o modificado, en comparación con una secuencia equivalente de origen natural. Los polinucleótidos sintéticos (anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno) o genes sintéticos pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, la síntesis química de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos. Típicamente los genes sintéticos son diferentes de los genes de origen natural, ya sea a nivel de aminoácidos, o polinucleótido, (o ambos) y se ubican típicamente dentro del contexto de secuencias de control de expresión sintéticas. Las secuencias de polinucleótidos de genes sintéticos, no codifican necesariamente proteínas con aminoácidos diferentes, en comparación con el gen natural; por ejemplo, también pueden incluir secuencias de polinucleótidos sintéticas que incorporan codones diferentes pero que codifican el mismo aminoácido (es decir, los cambios de nucleótidos representan mutaciones silentes a nivel de aminoácidos).

Con respecto a los anticuerpos, el término "dominio variable" se refiere a los dominios variables de los anticuerpos que se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Más bien, esta se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (también conocidas como CDR) tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las "regiones marco" o "FR." Cada uno de los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras no modificadas contiene cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan en su mayor parte una configuración de lámina β intercaladas con tres CDR que forman bucles conectores y, en algunos casos, parte de la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen unidas a corta distancia por las FR, y con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de los anticuerpos al antígeno (ver Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, Md. (1991), páginas 647-669).

Los términos "región hipervariable" y "CDR" cuando se usan en la presente descripción, se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. Las CDR comprenden residuos de aminoácidos de tres regiones de secuencia que se unen de una manera complementaria a un antígeno y se conocen como CDR1, CDR2, y CDR3 para cada una de las cadenas VH y VL. En el dominio variable de cadena ligera, las CDR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3), y en el dominio variable de cadena pesada las CDR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) de acuerdo con Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, Md. (1991)). Se entiende que las CDR de anticuerpos diferentes pueden contener inserciones, por lo tanto la numeración de los aminoácidos puede diferir. El sistema de numeración de Kabat representa tales inserciones con un esquema de numeración que utiliza letras unidas a residuos específicos (por ejemplo, 27A, 27B, 27C, 27D, 27E, y 27F de CDRL1 en la cadena ligera) para reflejar cualquiera de las inserciones en las numeraciones entre anticuerpos diferentes. Alternativamente, en el dominio variable de cadena ligera, las CDR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 26-32 (CDRL1), 50-52 (CDRL2) y 91-96 (CDRL3), y en el dominio variable de cadena pesada, las CDR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 26-32 (CDRH1), 53-55 (CDRH2) y 96-101 (CDRH3) de acuerdo con Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)).

Como se usa en la presente descripción, "región marco" o "FR" se refiere a residuos de aminoácidos de marco que forman una parte del bolsillo o surco de unión al antígeno. En algunas modalidades, los residuos de marco forman un bucle que es una parte del bolsillo o surco de unión al antígeno y los residuos de aminoácidos en el bucle pueden o no ponerse en contacto con el antígeno. Las regiones marco generalmente comprenden las regiones entre las CDR. En el dominio variable de cadena ligera, las FR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 0-23 (FRL1), 35-49 (FRL2), 57-88 (FRL3), y 98-109 y en el dominio variable de cadena pesada las FR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 0-30 (FRH1), 36-49 (FRH2), 66-94 (FRH3), y 103-133 de acuerdo con Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, Md. (1991)). Como se discutió anteriormente con la numeración de Kabat para la cadena ligera, la cadena pesada también representa las inserciones de manera similar (por ejemplo, 35A, 35B de CDRH1 en la cadena pesada). Alternativamente, en el dominio variable de cadena ligera, las FR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 0-25 (FRL1), 33-49 (FRL2) 53-90 (FRL3), y 97-109 (FRL4), y en el dominio variable de cadena pesada, las FR típicamente corresponden aproximadamente a los residuos 0-25 (FRH1), 33-52 (FRH2), 56-95 (FRH3), y 102-113 (FRH4) de acuerdo con Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)).

Los dominios constantes (Fc) de los anticuerpos no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno sino que, en su lugar, exhiben varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos por medio de la interacción con, por ejemplo, receptores de Fc (FcR). Además, los dominios Fc pueden aumentar la biodisponibilidad de un anticuerpo en circulación después de la administración a un paciente. La sustitución de un dominio Fc murino por un dominio Fc humano puede reducir, además, las reacciones secundarias de los HAMA.

En dependencia de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada (Fc) que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

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

Los términos "porción de unión al antígeno de un anticuerpo," "fragmento de unión al antígeno," "dominio de unión al antígeno," "fragmento de anticuerpo" o un "fragmento funcional de un anticuerpo" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluidos dentro de tales términos incluyen, pero no se limitan a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que contiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que contiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, (1989) *Nature* 341:544 546), que contiene un dominio VH; y (vi) una CDR aislada. En esta definición se incluyen, además, las "mitades" de anticuerpos que comprenden una sola cadena pesada y una sola cadena ligera. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos también se incluyen en la presente descripción.

Las porciones "F(ab')₂" y "Fab" pueden producirse mediante el tratamiento de una Ig con una proteasa tal como pepsina y papaína, e incluyen fragmentos de anticuerpos generados por digestión de la inmunoglobulina cerca de los enlaces disulfuro que existen entre las regiones de bisagra en cada una de las dos cadenas pesadas. Por ejemplo, la papaína escinde IgG corriente arriba de los enlaces disulfuro que existen entre las regiones de bisagra en cada una de

5 las dos cadenas pesadas para generar dos fragmentos de anticuerpos homólogos en los cuales una cadena ligera compuesta de V_L y C_L (región constante de cadena ligera), y un fragmento de cadena pesada compuesto de V_H y la región C_{H1} ($\gamma 1$) en la región constante de la cadena pesada) se conectan en sus regiones C terminales a través de un enlace disulfuro. Cada uno de estos dos fragmentos de anticuerpos homólogos se denomina Fab'. La pepsina también
 10 escinde IgG corriente abajo de los enlaces disulfuro que existen entre las regiones de bisagra en cada una de las dos cadenas pesadas para generar un fragmento de anticuerpo ligeramente más grande que el fragmento en el cual se conectan los dos Fab' mencionados anteriormente en la región de bisagra. Este fragmento de anticuerpo se denomina $F(ab')_2$.

10 El fragmento Fab contiene además el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo del dominio C_{H1} de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente descripción para el Fab' en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se produjeron originalmente
 15 como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. Se conocen, además, otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

"Fv" se refiere a un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente o covalente (Fv unidos por disulfuro se han descrito en la técnica, Reiter y otros. (1996) Nature Biotechnology 14:1239-1245). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Conjuntamente, una combinación de una o más de las CDR de cada una de las cadenas V_H y V_L confiere al anticuerpo su especificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, se entenderá que, por ejemplo, las CDRH3 y CDRL3 pueden ser suficientes para conferir a un anticuerpo su especificidad de unión al antígeno cuando se transfieren a las cadenas V_H y V_L de un anticuerpo receptor o fragmento de unión al antígeno de este y esta combinación de CDR puede probarse para la unión, afinidad, etc. mediante el uso de cualquiera de las técnicas descritas en la presente descripción. Incluso un solo dominio variable (o mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque probablemente con una afinidad menor que cuando se combina con un segundo dominio variable. Además, aunque los dos dominios de un fragmento Fv (V_L y V_H), se codifican por genes independientes, pueden unirse mediante el uso de métodos recombinantes por un enlazador sintético que permite que se produzcan como una sola cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv); Bird y otros. (1988) Science 242:423-426; Huston y otros. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Osbourn y otros. (1998) Nat. Biotechnol. 16:778). Se pretende que tales scFv también se incluyan dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Cualquiera de las secuencias V_H y V_L de scFv específicos puede unirse a un ADNc o a secuencias genómicas de región Fc, para generar vectores de expresión que codifican moléculas de Ig completas (por ejemplo, IgG) u otros isotipos. V_H y V_L pueden usarse, además, en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de Ig mediante el uso de química de proteínas o tecnología de ADN recombinante.
 20
 25
 30
 35
 40

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En algunas modalidades, el polipéptido Fv comprende, además, un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L lo que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una reseña de scFv ver, por ejemplo, Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).
 45

El término "AVIMER™" se refiere a una clase de proteínas terapéuticas de origen humano, que no se relacionan con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y se componen de varios dominios de unión modulares y reutilizables, referidos como dominios A (también referidos como módulo de clase A, repetición de tipo complemento, o dominio clase A de receptor de LDL). Estos se desarrollaron a partir de dominios extracelulares de receptores humanos mediante barajado de exones *in vitro* y presentación en fagos (Silverman y otros, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-1494; Silverman y otros, 2006, Nat. Biotechnol. 24:220). Las proteínas resultantes pueden contener múltiples dominios de unión independientes que pueden exhibir mayor afinidad (en algunos casos, subnanomolar) y especificidad en comparación con proteínas de unión a un solo epítipo. Ver, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0053973 y 2005/0089932, 2005/0048512, y 2004/0175756.
 50
 55

Cada uno de los 217 dominios A humanos conocidos comprende ~35 aminoácidos (~4 kDa); y estos dominios se encuentran separados por enlazadores con una longitud promedio de cinco aminoácidos. Los dominios A nativos se pliegan rápida y eficientemente para formar una estructura uniforme, estable mediada principalmente por la unión a calcio y formación de enlaces disulfuro. Un motivo de andamiaje conservado de solo 12 aminoácidos se requiere para esta estructura común. El resultado final es una sola cadena proteica que contiene múltiples dominios, cada uno de los cuales representa una función independiente. Cada dominio de las proteínas se une independientemente y las contribuciones energéticas de cada dominio son aditivas. Estas proteínas se denominaron "AVIMERS™" de múltiplos de avides.
 60
 65

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos

5 fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444 6448 (1993).

10 Los polipéptidos de unión al antígeno incluyen, además, dímeros de cadenas pesadas tales como, por ejemplo, anticuerpos de camélidos y tiburones. Los anticuerpos de camélidos y tiburones comprenden un par homodimérico de dos cadenas de dominios de tipo V y de tipo C (ninguno tiene una cadena ligera). Dado que la región VH de un dímero de cadena pesada de IgG en un camélido no tiene que hacer interacciones hidrofóbicas con una cadena ligera, la región en la cadena pesada que normalmente se pone en contacto con una cadena ligera se cambia a residuos de aminoácidos hidrofílicos en un camélido. Los dominios V_H de dímeros de cadenas pesadas de IgG se denominan dominios V_{HH} . Los Ig-NAR de tiburón comprenden un homodímero de un dominio variable (denominado un dominio V-NAR) y cinco dominios constantes de tipo C (dominios C-NAR). En los camélidos, la diversidad del repertorio de anticuerpos se encuentra determinada por las CDR 1, 2, y 3 en las regiones VH o VHH. La CDR3 en la región V_{HH} de camello se caracteriza por su longitud relativamente grande, de 16 aminoácidos como promedio (Muyldermans y otros, 1994, Protein Engineering 7(9): 1129). Esto se contrapone a las regiones CDR3 de los anticuerpos de muchas otras especies. Por ejemplo, la CDR3 de VH de ratón tiene un promedio de 9 aminoácidos. Las bibliotecas de regiones variables de anticuerpos derivados de camélidos, que mantienen la diversidad *in vivo* de las regiones variables de un camélido, pueden prepararse, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos con núm. de serie 20050037421.

25 Las formas "quiméricas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) incluyen anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de una Ig no humana. En su mayor parte, los anticuerpos quiméricos son anticuerpos murinos en los cuales al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana se inserta en lugar del Fc murino. Para detalles, ver Jones y otros, Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann y otros, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

30 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo obtenido a partir 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. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que pueden incluir anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y otros, Nature, 256:495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,816,567). En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos mediante el uso de las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y otros, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y otros, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

45 Los anticuerpos pueden aislarse y purificarse a partir del sobrenadante de cultivo o ascitis mencionados anteriormente por precipitación con sulfato de amonio saturado, método de precipitación con euglobulina, método de ácido caproico, método de ácido caprílico, cromatografía de intercambio iónico (DEAE o DE52), o cromatografía de afinidad mediante el uso de columna de anti-Ig o una columna de proteína A, G o L tal como se describe en más detalle más abajo.

50 Cuando se construye una molécula de inmunoglobulina, las regiones variables o porciones de estas pueden fusionarse a, conectarse con, o de cualquier otra manera unirse a una o más regiones constantes o porciones de estas para producir cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente descripción. Esto puede realizarse en una variedad de maneras conocidas en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, técnicas de clonación molecular o síntesis directa de los ácidos nucleicos que codifican las moléculas.

55 Como se usa en la presente descripción, "inmunorreactivo" se refiere a agentes aglutinantes, anticuerpos o fragmentos de estos que son específicos para una secuencia de residuos de aminoácidos ("sitio de unión" o "epítomos"), incluso si tienen reactividad cruzada con otros péptidos/proteínas, no son tóxicos a los niveles a los cuales se formulan para la administración para uso humano. El término "unión" se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrofóbicas, e iónicas y/o enlaces de hidrógeno en condiciones fisiológicas, y que incluyen interacciones tales como puentes salinos y puentes con agua y cualquier otro medio de unión convencional. El término "se une preferentemente" significa que el agente aglutinante se une al sitio de unión con mayor afinidad que con la que se une a secuencias de aminoácidos no relacionadas. La afinidad puede ser al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 6 veces mayor, al menos 7 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 9 veces mayor, 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 40 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 60

veces mayor, al menos 70 veces mayor, al menos 80 veces mayor, al menos 90 veces mayor, al menos 100 veces mayor, o al menos 1000 veces mayor que la afinidad del agente aglutinante por secuencias de aminoácidos no relacionadas. Los términos "inmunorreactivo" y "se une preferentemente" se usan indistintamente en la presente descripción.

5

Como se usa en la presente descripción, el término "afinidad" se refiere a la constante de equilibrio para la unión reversible de dos agentes y se expresa como Kd. La afinidad de una proteína de unión por un ligando tal como la afinidad de un anticuerpo por un epítipo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nanomolar (nM) a aproximadamente 0,1 nM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 picomolar (pM), o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 femtomolar (fM). Como se usa en la presente descripción, el término "avidez" se refiere a la resistencia de un complejo de dos o más agentes a la disociación después de la dilución. Las afinidades aparentes pueden determinarse por métodos tales como un ensayo de inmuoadsorción ligado a enzimas (ELISA) o cualquier otra técnica familiar para un experto en la técnica. La avidez puede determinarse por métodos tales como un análisis de Scatchard o cualquier otra técnica familiar para un experto en la técnica.

15

"Epítipo" se refiere a la porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión con el bolsillo de unión de la región variable de un anticuerpo. Tales interacciones de unión pueden manifestarse como un contacto intermolecular con uno o más residuos de aminoácidos de una o más CDR. En la unión al antígeno pueden participar, por ejemplo, una CDR3 o un par de CDR3 o, en algunos casos, interacciones de hasta las seis CDR de las cadenas V_H y V_L. Un epítipo puede ser una secuencia peptídica lineal (es decir, "continuo") o puede componerse de secuencias de aminoácidos no contiguas (es decir, "conformacional" o "discontinuo"). Un anticuerpo puede reconocer una o más secuencias de aminoácidos; por lo tanto un epítipo puede definir más de una secuencia de aminoácidos distinta. Los epítipos reconocidos por anticuerpos pueden determinarse por técnicas de mapeo peptídico y análisis de secuencias muy conocidas para un experto en la técnica. Las interacciones de unión se manifiestan como contactos intermoleculares con uno o más residuos de aminoácidos de una CDR. TRC105 es un anticuerpo murino que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo murino descrito como Y4-2F1 o SN6j en las patentes de Estados Unidos núm. 5,928,641; 6,200,566; 6,190,660; y 7,097,836. Los epítipos reconocidos por Y4-2F1 y SN6j, y por lo tanto por TRC105, se han identificado previamente.

30

El término "específico" se refiere a una situación en la cual un anticuerpo no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas al antígeno que contiene el epítipo reconocido por el anticuerpo. El término es aplicable, además, cuando por ejemplo, un dominio de unión al antígeno es específico para un epítipo particular portado por una serie de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo será capaz de unirse a los diversos antígenos que portan el epítipo. Los términos "se une preferentemente" o "se une específicamente" significan que los anticuerpos se unen a un epítipo con mayor afinidad que con la que se unen a secuencias de aminoácidos no relacionadas, y, si tienen reactividad cruzada con otros polipéptidos que contienen el epítipo, no son tóxicos a los niveles a los que se formulan para la administración para uso humano. En un aspecto, dicha afinidad es al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 6 veces mayor, al menos 7 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 9 veces mayor, 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 40 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 60 veces mayor, al menos 70 veces mayor, al menos 80 veces mayor, al menos 90 veces mayor, al menos 100 veces mayor, o al menos 1000 veces mayor que la afinidad del anticuerpo por secuencias de aminoácidos no relacionadas. Los términos "inmunorreactivo," "se une," "se une preferentemente" y "se une específicamente" se usan indistintamente en la presente descripción. El término "unión" se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrofóbicas, e iónicas y/o enlaces de hidrógeno en condiciones fisiológicas, e incluyen interacciones tales como puentes salinos y puentes con agua, así como cualquier otro medio de unión convencional.

50

"Aislado" (que se usa indistintamente con "sustancialmente puro") cuando se aplica a polipéptidos significa un polipéptido o una porción de este que, en virtud de su origen o manipulación: (i) está presente en una célula huésped como el producto de expresión de una porción de un vector de expresión; o (ii) se encuentra unido a una proteína u otra porción química distinta a aquella a la que se une en la naturaleza; o (iii) no se produce en la naturaleza, por ejemplo, una proteína que se manipula químicamente mediante la anexión, o adición de al menos una porción hidrofóbica a la proteína de manera que la proteína esté en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Por "aislado" se entiende, además, una proteína que: (i) se sintetiza químicamente; o (ii) se expresa en una célula huésped y se purifica separada de proteínas asociadas y contaminantes. El término generalmente significa un polipéptido que se ha separado de otras proteínas y ácidos nucleicos con los cuales se produce naturalmente. Típicamente, el polipéptido se separa, además, de sustancias tales como anticuerpos o matrices de geles (poliacrilamida) que se usan para purificarlo.

60

Terminología de angiogénesis

65

Como se usa en la presente descripción, los términos "inhibidor de la angiogénesis," "que inhibe la angiogénesis" o "antiangiogénico" incluyen la inhibición de la vasculogénesis, y se refieren a efectuar una disminución en la extensión, cantidad, o velocidad de neovascularización. Efectuar una disminución en la extensión, cantidad, o velocidad de proliferación o migración de células endoteliales en el tejido es un ejemplo específico de inhibición de la angiogénesis.

65

El término "composición inhibidora de la angiogénesis" se refiere a una composición que inhibe los procesos mediados

por la angiogénesis tales como migración de células endoteliales, proliferación, formación del tubo y que conduce posteriormente a la inhibición de la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes, y por consiguiente afecta las condiciones dependientes de la angiogénesis.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "condición dependiente de la angiogénesis" se refiere a una condición en la que los procesos de angiogénesis o vasculogénesis mantienen o aumentan una condición patológica o influyen beneficiosamente sobre los procesos fisiológicos normales. Por lo tanto, el tratamiento de una condición dependiente de la angiogénesis en la que la angiogénesis mantiene una condición patológica puede dar lugar a la mitigación de la enfermedad, mientras que el tratamiento de una condición dependiente de la angiogénesis en la que la angiogénesis influye beneficiosamente sobre procesos fisiológicos normales puede dar lugar, por ejemplo, al aumento de un proceso normal.

15 La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes o vénulas poscapilares. La vasculogénesis es el resultado de la formación de nuevos vasos sanguíneos que se originan a partir de angioblastos los cuales son precursores de células endoteliales. Ambos procesos dan lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos y se incluyen en el significado del término condiciones dependientes de la angiogénesis. El término "angiogénesis" como se usa en la presente descripción pretende incluir la formación de novo de vasos tales como los que se originan a partir de la vasculogénesis así como los que se originan de la ramificación y el brote de nuevos vasos a partir de vasos, capilares y vénulas existentes. La angiogénesis puede incluir, además, la inducción de la señalización de ALK1 y la fosforilación y/o señalización de Smad 1/5/8 relacionada. CD105 se conoce, además, por su participación en la vía de señalización de ALK1 y por lo tanto también se incluye dentro del significado de angiogénesis.

25 Se han encontrado poblaciones de células CD105⁺ iniciadoras de tumores en carcinomas renales humanos. Las células CD105⁺ presentaban las características de células madre tumorales previamente descritas para células madre cancerosas presentes en otros tipos de tumor. Las células CD105⁺ observadas eran clonogénicas, expresaban marcadores de células madre y carecían de marcadores de diferenciación, podían diferenciarse in vitro en tipos de células epiteliales y endoteliales y podían generar in vivo tumores serialmente trasplantables. Los tumores, a pesar de derivarse de clones que expresan marcadores mesenquimales, son carcinomas epiteliales al igual que el tumor de origen y se caracterizan por el mantenimiento de una población tumorigénica CD105⁺ y por la presencia de una población CD105⁻ diferenciada no tumorigénica.

"Inducción de una respuesta inmunitaria del huésped" significa que un paciente experimenta alivio o reducción de los signos o síntomas de la enfermedad, y específicamente incluye, sin limitación, la prolongación de la supervivencia.

35 Como se usa en la presente descripción, los términos "trastorno proliferativo" y "afección proliferativa" significan cualquier condición fisiológica patológica o no patológica caracterizada por la proliferación aberrante o no deseada. Los términos "trastorno proliferativo celular" y "afección proliferativa celular" significan cualquier condición fisiológica patológica o no patológica caracterizada por la proliferación celular aberrante o no deseada, así como que incluyen condiciones caracterizadas por proliferación celular o supervivencia celular no deseada o no conveniente (por ejemplo, debido a una apoptosis deficiente), condiciones caracterizadas por apoptosis deficiente o aberrante, así como condiciones caracterizadas por supervivencia celular aberrante o no deseada o no conveniente. El término "trastorno de diferenciación" significa cualquier condición fisiológica patológica o no patológica caracterizada por diferenciación aberrante o deficiente.

45 Los trastornos proliferativos o de diferenciación susceptibles al tratamiento incluyen condiciones de enfermedad, benignas y neoplásicas, caracterizadas por cantidades de células, crecimiento celular o supervivencia celular anormales o no deseados. Tales trastornos o afecciones pueden constituir, por lo tanto, un estado de enfermedad e incluyen todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos con transformación maligna.

50 Las células que comprenden el trastorno proliferativo o de diferenciación pueden agregarse para formar una masa de células o dispersarse. Un "tumor no sólido" se refiere a neoplasias del sistema hematopoyético, tales como linfomas, mielomas y leucemias, o neoplasias de naturaleza difusa, ya que típicamente no forman una masa sólida. Los ejemplos particulares de leucemias incluyen por ejemplo, mieloma linfoblástico, mieloblástico y múltiple agudo y crónico.

55 El término "tumor sólido" se refiere a neoplasias o metástasis que típicamente se agregan y forman una masa. Tales trastornos incluyen neoplasmas o cánceres, que pueden afectar prácticamente cualquier tipo de célula o tejido, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, melanoma, trastornos metastásicos o trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Un tumor metastásico puede originarse a partir de una multitud de tipos de tumores primarios, que incluyen pero no se limitan a mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, cerebro, linfoides, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto), tracto genitourinario (útero, ovario, cervix, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, hígado, hueso, músculo, piel, etc.

65 Los carcinomas se refieren a enfermedades malignas de tejido epitelial o endocrino, e incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino, y melanomas. Los carcinomas

ilustrativos incluyen aquellos que se forman a partir de cervix, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon, hígado y ovario. El término incluye, además, carcinosarcomas, por ejemplo, los que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. El término adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular, o en el cual el tumor forma una estructura similar a una glándula.

5 Un tejido canceroso a tratar es, por ejemplo, un tejido endotelial que expresa un nivel anormal de endoglina. Como se usa en la presente descripción, el término "células transformadas" se refiere a células que se han convertido espontáneamente a un estado de crecimiento incontrolado, es decir, han adquirido la capacidad de crecer a través de un número indefinido de divisiones en cultivo. Las células transformadas pueden caracterizarse por términos tales como neoplásicas, anaplásicas y/o hiperplásicas, con respecto a su pérdida de control del crecimiento. Para los propósitos de esta invención, los términos "fenotipo transformado de células malignas de mamífero" y "fenotipo transformado" pretenden incluir, pero sin limitarse a, cualquiera de los rasgos fenotípicos siguientes asociados con la transformación celular de células de mamífero: inmortalización, transformación morfológica o del crecimiento, y tumorigenicidad, como se detecta por el crecimiento prolongado en cultivo celular, crecimiento en medios semisólidos, o crecimiento tumorigénico en animales inmunoincompetentes o singéneos.

20 El término "antígeno de célula tumoral" se define en la presente descripción como un antígeno que está presente en mayores cantidades en una célula tumoral o en fluidos corporales que en células tumorales no relacionadas, células normales, o en fluido corporal normal. La presencia del antígeno puede probarse mediante cualquier número de ensayos conocidos para los expertos en la técnica e incluyen sin limitación la selección negativa y/o positiva con anticuerpos, tales como un ensayo ELISA, un radioinmunoensayo, o por transferencia Western.

25 Los términos "apoptosis" o "muerte celular programada," se refieren al proceso fisiológico mediante el cual las células no deseadas o inútiles se eliminan durante el desarrollo y otros procesos biológicos normales. La apoptosis es un modo de muerte celular que se produce en condiciones fisiológicas normales y la célula es un participante activo en su propio deceso ("suicidio celular"). Se encuentra con mayor frecuencia durante el recambio celular normal y la homeostasis de los tejidos, la embriogénesis, la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica, el desarrollo del sistema nervioso y la atrofia de tejidos dependiente de sustancias endocrinas. Las células que experimentan apoptosis muestran características morfológicas y bioquímicas particulares. Estas características incluyen agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplasmática, partición de citoplasma y núcleo en vesículas unidas a membrana (cuerpos apoptóticos), que contienen ribosomas, mitocondrias morfológicamente intactas y material nuclear. *In vivo*, estos cuerpos apoptóticos se reconocen rápidamente y se fagocitan por macrófagos, células dendríticas o células epiteliales adyacentes. Debido a este mecanismo eficiente para la eliminación de células apoptóticas *in vivo* no se induce una respuesta inflamatoria. *In vitro*, los cuerpos apoptóticos así como los fragmentos celulares restantes en última instancia se hinchan y por último se lisan. Esta fase terminal de muerte celular *in vitro* se ha denominado "necrosis secundaria." La apoptosis puede medirse por métodos conocidos para los expertos en la técnica como fragmentación de ADN, exposición de Anexina V, activación de caspasas, liberación de citocromo c, etc. Una célula cuya muerte se ha inducido se denomina en la presente descripción una "célula apoptótica."

40 "Agente inductor de la apoptosis" se define en la presente descripción para inducir apoptosis/muerte celular programada, e incluye, por ejemplo, anticuerpos antiendoglina, anticuerpos anti-VEGF, irradiación, agentes quimioterapéuticos o agentes de unión a receptor, en donde se induce la muerte celular programada de las células, por ejemplo, de células tumorales o células endoteliales. Los agentes inductores de la apoptosis ilustrativos se describen en más detalle más abajo.

45 La apoptosis puede probarse mediante el uso de un ensayo estándar de apoptosis con Anexina V: células NIH:OVCAR-3 se cultivan en placas de 6 pocillos (NUNC) y se irradian o tratan con un antagonista (o en combinación con otro fármaco anticancerígeno) durante 4-48 horas, se lavan y se tiñen con Anexina V-FITC (BD-Pharmingen) durante 1 hora. Las células se analizan por citometría de flujo (Becton-Dickinson, CellQuest), se tiñen por contraste con yoduro de propidio y se analizan nuevamente en el citómetro de flujo.

Métodos para preparar y expresar anticuerpos

55 Se han construido inmunoglobulinas quiméricas por medio de ingeniería genética. La mayoría de las inmunoglobulinas quiméricas que se han descrito previamente comprenden una V_H y V_L de un anticuerpo monoclonal de ratón y una C_L y Fc de un anticuerpo humano. Pueden usarse las regiones Fc de cualquiera de los isotipos descritos en la presente descripción. Como se describe en la presente descripción, quimérico puede incluir, además, los criterios mediante los cuales un número limitado de aminoácidos en el marco de la región variable de cadena ligera y/o la cadena variable de cadena pesada se modifican para aumentar la afinidad de un anticuerpo.

60 Los anticuerpos quiméricos generalmente tienen varias ventajas potenciales respecto a los anticuerpos de ratón para el uso en la terapia humana. Debido a que la porción efectora de un anticuerpo es humana, se cree que interactúa mejor con las otras partes del sistema inmunológico humano (por ejemplo, destruye las células objetivo con mayor eficiencia por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)). Además, el sistema inmunológico humano no debe reconocer la región constante del anticuerpo quimérico como extraño, y por lo tanto la respuesta de anticuerpos contra un anticuerpo inyectado de este tipo, típicamente, debe ser

menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente extraño. Por último, se conoce que los anticuerpos de ratón tienen una vida media en la circulación humana que es mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos, supuestamente, pueden tener una vida media más similar a la de anticuerpos humanos de origen natural, lo que permite administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

5 Cuando se desea aumentar la afinidad de un anticuerpo quimérico, los residuos dentro de las CDR de un anticuerpo pueden sustituirse, además, con otros aminoácidos. Típicamente, no se cambian más de cuatro residuos de aminoácidos en una CDR, y más típicamente no se cambiarán más de dos residuos en la CDR, excepto por la CDR2 de cadena pesada, donde pueden cambiarse tanto como 10 residuos. Los cambios en la afinidad pueden medirse por métodos convencionales tales como los descritos en la presente descripción (por ejemplo, Biacore).

10 Los anticuerpos quiméricos pueden construirse y producirse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas en la técnica. Además, los anticuerpos preparados de manera recombinante pueden producirse frecuentemente en grandes cantidades, particularmente cuando se utilizan vectores de expresión a altos niveles.

15 Para usos veterinarios, un anticuerpo puede sintetizarse para su administración a un no humano (por ejemplo, un primate, una vaca, un caballo, un cerdo, etc.) mediante el uso de un Fc no humano.

20 Las técnicas reconocidas en la técnica tales como las que se proporcionan en la presente descripción, pueden usarse para modificar nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos mediante el uso de técnicas recombinantes en sitios de endonucleasas de restricción.

25 Para la expresión, un sistema de expresión es uno que utiliza el sistema GS (Lonza) que usa un gen de glutamina sintetasa como el marcador de selección. Brevemente, se realiza una transfección en células CHO por electroporación (250 V) mediante el uso del sistema GS (Lonza) que usa el gen de glutamina sintetasa como el marcador de selección. Se cultivan células CHO de tipo silvestre en DMEM (Sigma) que contiene suero fetal de ternera (FCS) al 10 % dializado con glutamina 2 mM. Se transfectan por electroporación 6x10⁷ células CHO con 300 µg de ADN linealizado. Después de la electroporación las células se resuspenden en DMEM con glutamina y se siembran en placas de 36x96 pocillos (50 µl/pocillo), y se incuban a 37 °C. en 5 % de CO₂. Al día siguiente, se añade 150 µl/pocillo de medio de selección (DMEM sin glutamina). Después de aproximadamente 3 semanas las colonias se tamizan por ELISA (ver más abajo) mediante el uso de un anticuerpo irrelevante como control negativo. Todas las colonias que producen >20 µg/ml se expanden en placas de 24 pocillos y después en matraces T25 duplicados.

35 Para altos niveles de producción, un sistema de expresión en mamíferos de amplio uso es uno que utiliza el procedimiento de amplificación de genes ofrecido por las células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa ("dhfr-"). El sistema se basa en el gen de dihidrofolato reductasa "*dhfr*", que codifica la enzima DHFR, la cual cataliza la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Para lograr una producción alta, las células CHO dhfr- se transfectan con un vector de expresión que contiene un gen de DHFR funcional, junto con un gen que codifica una proteína deseada. En este caso, la proteína deseada es cadena pesada y/o cadena ligera de anticuerpo recombinante.

40 Al aumentar la cantidad del inhibidor competitivo de DHFR metotrexato (MTX), las células recombinantes desarrollan resistencia mediante la amplificación del gen *dhfr*. En casos estándares, la unidad de amplificación empleada es mucho más grande que el tamaño del gen *dhfr*, y como resultado la cadena pesada del anticuerpo se amplifica conjuntamente.

45 Cuando la producción a gran escala de la proteína, tal como la cadena de anticuerpo, se desea, tanto el nivel de expresión como la estabilidad de las células empleadas se tienen en cuenta. En cultivo a largo plazo, las poblaciones de células CHO recombinantes pierden homogeneidad con respecto a su productividad de anticuerpos específicos durante la amplificación, aun cuando se derivan de un solo clon de origen.

50 La presente solicitud proporciona un polinucleótido (ácido nucleico) aislado que codifica un anticuerpo o porción de este como se describe en la presente descripción, los vectores que contienen tales polinucleótidos, y células huésped y sistemas de expresión para transcribir y traducir tales polinucleótidos a polipéptidos.

55 La presente solicitud proporciona, además, las construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se describió anteriormente.

60 La presente invención proporciona, además, una célula huésped recombinante que comprende una más construcciones como se describió anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo descrito en la presente descripción forma un aspecto de la presente solicitud, al igual que un método de producción del anticuerpo, cuyo método comprende la expresión a partir del ácido nucleico que lo codifica. La expresión puede lograrse convenientemente mediante el cultivo en condiciones apropiadas de células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un anticuerpo o porción de este puede aislarse y/o purificarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, y después usarse según corresponda.

65 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos específicos (o porciones de estos) y los vectores que las contienen descritos en la presente descripción pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de

su medio ambiente natural, en forma sustancialmente pura u homogénea. En el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser completamente o parcialmente sintéticas. Los métodos de purificación se conocen bien en la técnica.

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes se conocen bien. Las células huésped adecuadas incluyen sistemas de bacterias, células de mamíferos, levaduras y baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células NS0 de mieloma de ratón y muchas otras.

Una amplia variedad de células huésped unicelulares también son útiles para expresar las secuencias de ADN. Estos huéspedes incluyen huéspedes eucariotas y procariotas muy conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como células CHO, YB/20, NS0, SP2/0, RI.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insectos (por ejemplo, Sf9), y células humanas y células vegetales en cultivo de tejidos.

La expresión de anticuerpos o porciones de estos en células procariotas tales como *E. coli* se encuentra bien establecida en la técnica. Para una reseña, ver por ejemplo Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991).

La expresión en células eucariotas en cultivo también se encuentra disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de los anticuerpos descritos en la presente descripción, ver para reseñas recientes, por ejemplo, Raff, M.E. (1993) *Curr. Opinión Biotechnol.* 4: 573-576; Trill J.J. y otros. (1995) *Curr. Opinión Biotech* 6: 553-560.

Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por ejemplo fagos, o fagémidos, según corresponda. Para más detalles ver, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2da edición, Sambrook y otros, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de las construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Short Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel y otros. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Por lo tanto, la solicitud proporciona, además, una célula huésped que contiene ácido nucleico como se describe en la presente descripción. La solicitud aún proporciona, además, un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante el uso de retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección mediante el uso de bacteriófagos.

Puede darse seguimiento a la introducción al causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en las condiciones para la expresión del gen.

En un caso, el ácido nucleico se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar. Los aumentos de Ig pueden iniciarse según sea necesario para maximizar la expresión.

La presente solicitud describe, además, un método que comprende el uso de una construcción como se indicó anteriormente en un sistema de expresión para expresar los anticuerpos (o porciones de estos) como se describió anteriormente.

La presente solicitud se refiere, además, a ácidos nucleicos aislados, tales como moléculas de ADN recombinante o genes clonados, o variantes degeneradas de estos, mutantes, análogos, o fragmentos de estos, que codifican un anticuerpo quimérico que se une a la endoglina.

En un caso adicional, la secuencia de ADN completa de la molécula de ADN recombinante o gen clonado de un anticuerpo o porción de este descrito en la presente descripción puede unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión que puede introducirse en un huésped apropiado. En consecuencia, la solicitud se extiende a huéspedes unicelulares transformados con el gen clonado o la molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica la V_H , V_L , C_L y/o F_c , del anticuerpo.

Otra característica es la expresión de las secuencias de ADN descritas en la presente descripción. Como bien se conoce en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse mediante su unión operativa a una secuencia de

control de la expresión en un vector de expresión apropiado y el empleo de ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado.

5 Dicha unión operativa de una secuencia de ADN a una secuencia de control de la expresión, por supuesto, incluye, si no ya parte de la secuencia de ADN, la provisión de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto corriente arriba de la secuencia de ADN.

10 Los polinucleótidos y vectores pueden proporcionarse en una forma aislada y/o purificada (por ejemplo, libre o sustancialmente libre de polinucleótidos de origen distinto al polinucleótido que codifica un polipéptido con la función requerida). Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente puro," y "sustancialmente libre" se refieren a una solución o suspensión que contiene menos de, por ejemplo, aproximadamente 20 % o menos material extraño, aproximadamente 10 % o menos material extraño, aproximadamente 5 % o menos material extraño, aproximadamente 4 % o menos material extraño, aproximadamente 3 % o menos material extraño, aproximadamente 2 % o menos material extraño, o aproximadamente 1 % o menos material extraño.

15 Una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión pueden emplearse para expresar las secuencias de ADN. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los derivados del SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, los plásmidos de *E. coli* col E1, Pcr1, Pbr322, Pmb9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago λ , por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2u o derivados de estos; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insectos o de mamíferos; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

20 En la presente descripción se describe, además, una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones de polinucleótidos. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo como se proporciona en la presente descripción forma una parte de la presente solicitud, al igual que un método de producción del anticuerpo cuyo método comprende la expresión a partir de uno o más polinucleótidos. La expresión puede lograrse, por ejemplo, mediante el cultivo en condiciones apropiadas de células huésped recombinantes que contienen el polinucleótido. Un anticuerpo puede aislarse y/o purificarse después mediante el uso de cualquier técnica adecuada, y usarse según corresponda.

25 Cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión - secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN unida operativamente a ellas - puede usarse en estos vectores para expresar las secuencias de ADN. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, poliovirus, adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el sistema LTR, las regiones operadoras y promotoras principales del fago λ , las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de apareamiento de levaduras, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de estas.

30 Se entenderá que no todos los vectores, las secuencias de control de la expresión y los huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN. Ni todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, el experto en la técnica será capaz de seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión, y los huéspedes adecuados sin experimentación excesiva para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta solicitud. Por ejemplo, en la selección de un vector, debe considerarse el huésped debido a que el vector debe funcionar en él. El número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias, y la expresión de cualquiera de las otras proteínas codificadas por el vector, tales como los marcadores de resistencia a antibióticos, también se considerarán. El experto en la técnica puede seleccionar los vectores, la secuencia de control de la expresión, y los huéspedes adecuados para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta solicitud. Por ejemplo, en la selección de un vector, el huésped se considera debido a que el vector funciona en él. El número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias, y la expresión de cualquiera de las otras proteínas codificadas por el vector, tales como los marcadores de resistencia a antibióticos, también pueden considerarse.

35 La presente solicitud describe, además, construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión como se describe en otra parte en la presente descripción que comprenden al menos un polinucleótido como se describió anteriormente. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, marcadores de selección y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por ejemplo, fago, fagémido, etc., según corresponda. Para más detalles ver, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2da edición, Sambrook y otros, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de las construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Short Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel y otros. eds., John Wiley & Sons, 1992.

- En la selección de una secuencia de control de la expresión, normalmente se considerará una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fortaleza relativa del sistema, su capacidad de control, y su compatibilidad con la secuencia de ADN o gen particular a expresar, particularmente en lo que respecta a las estructuras secundarias potenciales. Los huéspedes unicelulares adecuados se seleccionarán en consideración a, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad de plegar las proteínas correctamente, y sus requisitos de fermentación, así como la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.
- Se proporciona, además, una célula huésped que contiene uno o más polinucleótidos como se describe en la presente descripción. Aún se proporciona, además, un método para introducir dichos uno o más polinucleótidos en una célula huésped, mediante cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante el uso de retrovirus u otros virus (por ejemplo, vaccinia) o, para células de insectos, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección mediante el uso de bacteriófagos.
- Puede darse seguimiento a la introducción al causar o permitir la expresión del uno o más polinucleótidos, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en condiciones para la expresión de uno o más polipéptidos a partir de uno o más polinucleótidos. Pueden usarse sistemas inducibles e inducirse la expresión mediante la adición de un activador.
- En un caso, los polinucleótidos pueden integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar. En otra modalidad, el ácido nucleico se mantiene en un vector episomal en la célula huésped.
- En la presente descripción se describen métodos que incluyen el uso de una construcción como se indicó anteriormente en un sistema de expresión para expresar un polipéptido específico.
- Mediante la consideración de estos y otros factores, un experto en la técnica será capaz de construir una variedad de combinaciones de vector/secuencia de control de la expresión/huésped que expresarán las secuencias de ADN en la fermentación o en el cultivo de células animales a gran escala.
- Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una porción de este puede prepararse de manera recombinante/por síntesis además de, o en lugar de, clonarse. El polinucleótido puede diseñarse con los codones apropiados. En general, se seleccionarán los codones preferidos para un huésped previsto si la secuencia se usa para la expresión. El polinucleótido completo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados por métodos estándar y ensamblarse para formar una secuencia codificante completa. Ver, por ejemplo, Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair y otros, Science, 223:1299 (1984); Jay y otros, J. Biol. Chem., 259:6311 (1984).
- La incorporación simultánea de los ácidos nucleicos que codifica anticuerpos (o porción de estos) y los cambios en las posiciones de aminoácidos seleccionadas pueden realizarse mediante una variedad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, que incluyen por ejemplo, síntesis recombinante y química.
- 45 Anticuerpos antiendoglina**
- La endoglina (CD105) se expresa en la superficie celular como una proteína transmembrana homodimérica de 180 kDa. El dominio externo se une a las isoformas TGF- β 1 y 3 con alta afinidad (50 nM), y los dominios transmembrana e intracelular de CD105 comparten un 71 % de similitud de secuencias con betaglucono. El gen de CD105 humano se ubica en el cromosoma 9q34, identificado mediante el uso de hibridación de fluorescencia *in situ*, y la región codificante contiene 14 exones, y se han caracterizado dos isoformas diferentes (L y S) de CD105 con capacidad de unirse a TGF- β . La L-CD105 consiste en 633 residuos de aminoácidos con 47 residuos de aminoácidos en la cola citoplasmática a diferencia de la S-CD105, que consiste en 600 residuos de aminoácidos con una cola citoplasmática de 14 aminoácidos. Sin embargo, L-CD105 es la forma predominante. CD105 se encuentra fosforilada constitutivamente en células endoteliales, fundamentalmente en residuos de serina y treonina, y esta fosforilación se debe a la activación constitutiva de TGF- β RII dentro de la célula. La unión de TGF- β a CD105 da lugar a la regulación negativa de la fosforilación, similar a los efectos observados con inhibidores de proteína quinasa C. La secuencia de aminoácidos de la CD105 humana contiene el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) ubicado en una región expuesta del dominio extracelular. El péptido RGD es una estructura de reconocimiento clave que se encuentra en proteínas de la ECM tales como fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand (vWF), colágeno tipo I, y fibrinógeno y se reconoce por integrinas de la superficie celular. La adhesión a integrinas se ha relacionado con la hemostasis, la trombosis, la angiogénesis y la inflamación, procesos en los cuales el endotelio desempeña una función crítica. (Duff y otros, FASEB J., 17:984-992 (2003)).
- CD105 es un miembro de la familia de receptores de TGF- β que se expresa en células endoteliales en proliferación. Niveles normales de CD105 son necesarios para la proliferación de células endoteliales. La expresión de CD105

5 aumenta por hipoxia celular a través de la producción del factor-1- α inducible por hipoxia (HIF-1- α) y protege a las células hipóxicas de la apoptosis. Varias funciones de CD105 se asocian con la señalización de TGF- β . TGF- β señala a través de receptores heterodiméricos que consisten en serina quinasa, receptor I (RI), y receptor II (RII). La unión de TGF- β a los dominios externos del receptor desenmascara la actividad quinasa citoplasmática de RII que fosforila el TGF- β RI, que puede interactuar después con señalizadores corriente abajo tales como las proteínas Smad. CD105 forma parte del complejo receptor de TGF- β pero puede existir independientemente en la superficie celular. En muchas células in vitro, CD105 suprime la señalización de TGF- β .

10 CD105 se une, además, a otros factores de crecimiento tales como activina A y proteínas morfogénicas óseas (BMP) -10, -9, -7 y -2. La unión de los ligandos TGF- β u otros factores de crecimiento a CD105 requiere la presencia de al menos el receptor RII, y no puede unirse a los ligandos por sí sola. La asociación de CD105 con receptores no altera su afinidad por el propio ligando. Tras la asociación, el dominio citoplasmático de CD105 se fosforila por TGF- β RI y TGF- β RII; después la quinasa de TGF- β RI, pero no de TGF- β RII, se disocia del complejo receptor.

15 La expresión de CD105 inhibe los niveles de fosforilación de TGF- β RII pero aumenta los de TGF- β RI, lo que da lugar al aumento de la fosforilación de Smad 2 pero no de Smad 3. Dado que Smad 2 puede interactuar con una variedad de factores de transcripción, coactivadores, y supresores, la Smad 2 fosforilada puede actuar como un integrador de múltiples señales para modular la transcripción génica. Por lo tanto, CD105 modula las funciones de TGF- β por medio de la interacción con TGF- β RI y TGF- β RII y modifica la fosforilación de las proteínas Smad corriente abajo.

20 CD105 actúa para modular la señalización de múltiples complejos de receptores quinasa de la superfamilia de TGF- β , que incluyen receptores de TGF- β (TGF- β R), quinasa del tipo receptor de activina (ALK) y receptores de activina. En ausencia de CD105, la activación de los receptores de TGF- β da lugar a la fosforilación de proteínas SMAD (SMAD 2 y 3) que inhiben el crecimiento de células endoteliales. Sin embargo, la activación de CD105 por TGF- β modula la fosforilación de proteínas SMAD (que incluye la fosforilación de SMAD 1, 5 y 8). El resultado final es la liberación de los efectos inhibidores del crecimiento de la activación del receptor de TGF- β en células endoteliales (ver la Figura 1). No es sorprendente que, la prevención de la activación de CD105 por un anticuerpo anti-CD105 o un oligonucleótido antisentido actúe sinérgicamente con TGF- β para suprimir el crecimiento de células endoteliales.

30 El promotor de CD105 tiene una longitud de 2,6 kb pero no contiene cajas de iniciación de la transcripción TATA o CAAT. Sin embargo, tiene dos regiones ricas en GC, motivos consenso para Sp1, ets, GATA, AP-2, NGF- β , y Mad, así como elementos de respuesta a TGF- β . Sin embargo, CD105 tiene una distribución celular relativamente restringida. El nivel basal de transcripción parece requerir un sitio ets en la posición -68 y los sitios Sp1, pero la restricción relativa de la expresión, por ejemplo, a células endoteliales, parece involucrar múltiples regiones reguladoras, en particular, una en -1294 a -932 y otra muy cercana al sitio de iniciación de la transcripción. CD105 se regula positivamente por TGF- β , y esto ha demostrado requerir un sitio Sp1 en -37 a -29, con participación, además, de uno o más sitios SBE corriente arriba yuxtapuestos que se unen a las Smad 3 y/o 4 (que se activan mediante la señalización de TGF- β). La hipoxia es una característica común de tejidos isquémicos y tumores, y es un estimulador potente de la expresión del gen de CD105 en células endoteliales (EC) vasculares. Un efecto de este tipo se potencia en combinación con TGF- β 1. La regulación positiva de CD105 puede ejercer una función de autoprotección en las EC bajo estrés hipóxico.

45 Las EC vasculares son la fuente principal de CD105. Otros tipos de células que incluyen células de músculo liso vascular, fibroblastos, macrófagos, células leucémicas de origen pre-B y mielomonocítico, y precursores eritroides expresan CD105 en menor extensión.

50 CD105 participa en la angiogénesis. Los experimentos antisentido han demostrado que la supresión de la expresión de CD105 en HUVEC da lugar a una inhibición marcada de la angiogénesis in vitro en combinación con TGF- β 1, lo que indica que CD105 es un componente proangiogénico en las células endoteliales. Evidencias adicionales de la función importante de CD105 en la angiogénesis provienen de ratones con desactivación génica de CD105. Los ratones nulos para CD105 exhiben múltiples defectos vasculares y cardíacos que conducen a la muerte en un estadio embrionario temprano. Varios defectos vasculares graves observados en ratones nulos para CD105 indican que CD105 se requiere para la formación de vasos sanguíneos maduros en la vasculatura extraembrionaria, lo que confirma, además, la función directa de la endoglina en la angiogénesis.

55 La endoglina, también conocida como, inter alia, CD105 o edg-1, es una glucoproteína de membrana homodimérica de tipo I que se expresa a altos niveles en células endoteliales vasculares en proliferación. Por lo tanto, la endoglina es principalmente un marcador asociado a la proliferación para células endoteliales que experimentan angiogénesis activa. Sin embargo, puede existir expresión limitada de endoglina en el endotelio vascular de tejidos normales. Se conoce que la endoglina humana se une específicamente al factor de crecimiento transformante β (TGF- β), y la secuencia de aminoácidos deducida de la endoglina tiene una fuerte homología con β -glucano, un tipo de receptor de TGF- β .

60 La endoglina (EDG) ha servido como objetivo en métodos basados en anticuerpos para reducir la vasculatura del tumor, ya que la EDG es un antígeno asociado a la proliferación en células endoteliales y leucémicas. Su expresión se regula positivamente en el endotelio vascular asociado al tumor, y la EDG es esencial para la angiogénesis. La angiogénesis incluye la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares lo que conduce a la neovascularización así como al mantenimiento de la vasculatura existente. Este es un proceso complejo que incluye una serie de etapas secuenciales

que incluyen la degradación mediada por células endoteliales de la membrana basal vascular y las matrices intersticiales, la migración de células endoteliales, la proliferación de células endoteliales, y la formación de bucles capilares por células endoteliales.

5 En la presente descripción se proporcionan anticuerpos quiméricos que se unen a la endoglina. La endoglina puede encontrarse en células que comprenden y soportan la vasculatura existente así como células que promueven el crecimiento de, y se vuelven parte de, la nueva vasculatura. Estos anticuerpos pueden unirse a la endoglina y de este modo inhibir la angiogénesis, inhibir la vasculatura existente o el mantenimiento de la vasculatura existente, y/o inhibir la dilatación de vasos pequeños. Además de su uso para la purificación de endoglina, estos anticuerpos son útiles para propósitos de purificación, detección y diagnóstico así como para propósitos terapéuticos. Los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden usarse para la formulación de medicamentos para el tratamiento de una variedad de afecciones y enfermedades, en métodos para tratar dichas afecciones y enfermedades y en métodos de detección o diagnóstico. Como se usa en la presente descripción, la angiogénesis incluye el crecimiento y/o desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (también referido como neovascularización), la dilatación de los vasos pequeños, el crecimiento vascular excesivo o prolongado, y el mantenimiento de la vasculatura existente. Las afecciones y enfermedades angiogénicas se refieren a aquellas enfermedades y afecciones relacionadas con, causadas por, o asociadas con la angiogénesis. Los ejemplos no limitantes de tales enfermedades incluyen, por ejemplo, varias formas de cáncer (tumores primarios y metástasis).

20 Se han levantado anticuerpos monoclonales (AcM) murinos contra endoglina que modulan la actividad de la endoglina y de este modo inhiben la angiogénesis y/o inhiben la vasodilatación de vasos sanguíneos pequeños. Estos anticuerpos murinos se describen en las patentes de Estados Unidos 5,928,641, 6,200,566, 6,190,660, y 7,097,836. Además, se ha demostrado la eficiencia *ex vivo* e *in vivo* de una serie de estos anticuerpos; los anticuerpos monoclonales que se unen a la endoglina son de interés como compuestos moduladores de endoglina. El uso terapéutico de anticuerpos murinos no es factible, sin embargo, ya que la administración de los anticuerpos murinos tiene una serie de limitaciones, que incluyen la inmunogenicidad en, por ejemplo, la forma de anticuerpos humanos antirratón (HAMA).

30 Se han descrito varios anticuerpos antiendoglina, en particular, anticuerpos monoclonales ("AcM") antiendoglina. El AcM SN6 es un anticuerpo generado a partir de la inmunización de ratones con mezclas de glucoproteínas de membranas celulares de células leucémicas humanas (Haruta y Seon, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7898-7902). SN6 es un AcM murino que reconoce la endoglina humana. El AcM 44G4 es un anticuerpo generado a partir de la inmunización de ratones con suspensiones de células completas de células leucémicas pre-B humanas (Gougos y Letarte, 1988, J. Immunol. 141:1925-1933; 1990, J. Biol. Chem. 265:8361-8364). 44G4 también es un AcM murino que reconoce la endoglina humana. El AcM MJ7/18 es un anticuerpo generado a partir de la inmunización de ratas con pieles de ratón inflamadas (Ge y Butcher, 1994, supra). MJ7/18 también es un AcM que reconoce la endoglina murina. El AcM Tec-11 es un anticuerpo generado a partir de la inmunización de ratones con células endoteliales de la vena umbilical humana (Burrows y otros, 1995, Clin. Cancer Res. 1:1623-1634). Tec-11 es un AcM murino con reactividad restringida a la endoglina humana. Uneda y otros (2009) Int. J. Cancer: 125, 1446-53 describe un estudio en el cual 3 anticuerpos monoclonales antiendoglina SN6a, SN6j y SN6k, que definen individualmente distintos epítomos de endoglina de vasculatura tumoral, son capaces de suprimir la metástasis tumoral en modelos de metástasis. En la presente descripción se describen anticuerpos quiméricos que se unen a la endoglina que exhiben inmunogenicidad reducida mientras mantienen y/o mejoran su especificidad. Además, para abordar los problemas asociados con los anticuerpos murinos, en la presente descripción se describen anticuerpos quiméricos que se unen a la endoglina y disminuyen y/o inhiben la angiogénesis que exhiben inmunogenicidad reducida mientras mantienen y/o mejoran su especificidad. Estos anticuerpos antiendoglina quiméricos son útiles para el diagnóstico y tratamiento de varias afecciones y enfermedades así como para la purificación y detección de la endoglina. Los anticuerpos contra endoglina representan un área importante para el desarrollo de terapias para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones en las que la angiogénesis participa, influye, o afecta.

50 En la presente descripción se proporcionan anticuerpos quiméricos de estos que se unen a la endoglina. Se proporcionan, además, anticuerpos quiméricos de estos que se unen a la endoglina e inhiben (parcialmente o completamente) o controlan/tratan (parcialmente o completamente) la angiogénesis/neovascularización, la dilatación de vasos pequeños, la inhibición de la proliferación celular o la inhibición del crecimiento tumoral. De manera similar, la inhibición de la función de la endoglina (por ejemplo, señalización, unión, activación, y similares) también se incluye dentro del significado de inhibición o unión a la endoglina. Aún en otra modalidad, un anticuerpo quimérico inhibe la angiogénesis mediante su unión a la endoglina. La solicitud proporciona, además, líneas celulares que pueden usarse para producir los anticuerpos quiméricos, métodos para producir las líneas celulares, métodos para expresar anticuerpos y purificarlos.

60 Puede reconocerse que los anticuerpos que se unen específicamente a la endoglina generados mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción pueden probarse mediante el uso de los ensayos proporcionados en la presente descripción o conocidos en la técnica para determinar la capacidad de unión a la endoglina mediante el uso de métodos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, ELISA. La afinidad de los anticuerpos descritos en la presente descripción también puede determinarse mediante el uso de métodos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, Biacore o resonancia de plasmones superficiales.

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos quiméricos que se unen a la endoglina. En la presente descripción se proporcionan, además, anticuerpos quiméricos que se unen a la endoglina e inhiben la angiogénesis.

5 En la presente descripción se proporciona un anticuerpo quimérico que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 1, una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 2, una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 3 y una región constante (Fc) gamma 1 ($\gamma 1$) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 4.

15 En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un anticuerpo quimérico capaz de competir con un anticuerpo antiendoglina quimérico descrito en la presente descripción en condiciones en las que se bloquea la unión a la endoglina de al menos 5 % de un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L del anticuerpo mediante la competencia con un anticuerpo de este tipo en un ensayo ELISA.

20 En la presente descripción se proporcionan anticuerpos quiméricos neutralizantes que se unen a la endoglina y modulan la actividad de la endoglina. El anticuerpo neutralizante puede inhibir, por ejemplo, la angiogénesis mediante la unión a la endoglina.

25 El porcentaje (%) de inhibición de la angiogénesis, la proliferación celular y/o el crecimiento tumoral por un anticuerpo antiendoglina quimérico de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, o mayor que los controles negativos es indicativo de un anticuerpo que inhibe la angiogénesis. El porcentaje (%) de inhibición de la angiogénesis, la proliferación celular y/o el crecimiento tumoral por un anticuerpo antiendoglina quimérico de menos de 2 veces mayor que los controles negativos es indicativo de un anticuerpo que no inhibe la angiogénesis.

30 La unión de un anticuerpo quimérico a la endoglina puede inhibir parcialmente (por ejemplo, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o cualquier número entre estos) o completamente la angiogénesis, la proliferación celular y/o el crecimiento tumoral. La actividad neutralizante o inhibidora de un anticuerpo quimérico puede determinarse mediante el uso de un ensayo *in vitro* y/o *in vivo* mediante el uso de ensayos reconocidos en la técnica tales como los descritos en la presente descripción o de cualquier otra manera conocidos en la técnica.

35 Los anticuerpos descritos en la presente descripción son útiles en aplicaciones de detección o diagnóstico como se describe en más detalle más abajo. Los anticuerpos descritos en la presente descripción son útiles para la unión a la endoglina, lo que, a su vez, puede inhibir la angiogénesis como se describe en la presente descripción.

40 Agentes anti- VEGF

45 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se ha identificado como una proteína que induce la proliferación y migración de células endoteliales *in vitro*, y la permeabilización de los vasos sanguíneos y la angiogénesis *in vivo*. Regula tanto la proliferación vascular como la permeabilidad. También conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), es único entre los factores proangiogénicos debido a su especificidad por el endotelio vascular y su potencia. Funciona, además, como un factor antiapoptótico para células endoteliales en los vasos recién formados. VEGF se expresa en células tumorales, macrófagos, células T, células de músculo liso, células de riñón, células mesangiales, queratinocitos, astrocitos, y osteoblastos.

50 "VEGF humano" se refiere en una modalidad al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos, y los factores de crecimiento de células endoteliales vasculares relacionados de 121, 189, y 206 aminoácidos, como se describe en Leung y otros, Science 246: 1306 (1989); y Houck y otros, Mol. Endocrin., 5: 1806 (1991) junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de esos factores de crecimiento. El término "VEGF" se refiere, además, a los VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. En algunos casos, el VEGF de una especie específica se indica mediante términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino, y etc. El término "VEGF" se usa, además, para referirse a las formas truncadas del polipéptido que comprenden los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en el VEGF nativo truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene una afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable a la del VEGF nativo. De acuerdo con una modalidad, el VEGF es un VEGF humano.

65 La familia de VEGF comprende siete miembros, que incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, y factor de crecimiento placentario (PlGF). Todos ellos tienen una estructura común de ocho residuos de cisteína en un dominio de homología de VEGF. Además, con relación a VEGF-A, existen seis isoformas diferentes, y VEGF-A165 es la isoforma principal. Todas estas isoformas tienen funciones distintas y superpuestas en la angiogénesis. El gen de VEGF

se ubica en el cromosoma 6p.21. Los diferentes miembros de la familia de VEGF tienen propiedades físicas y biológicas diferentes y pueden actuar a través de receptores tirosina quinasa específicos (VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3). El receptor VEGFR-3 y sus ligandos, VEGF-C y VEGF-D, se asocian con la linfangiogénesis, mientras que PlGF se vincula a la arteriogénesis.

5 Se han caracterizado dos receptores de alta afinidad por VEGF, VEGFR-1/Flt1 (tirosina quinasa-1 similar a fms) y VEGFR-2/Kdr/Flk-1 (receptor que contiene dominio inserto quinasa/quinasa hepática fetal-1). Se conoce, además, un tercer receptor, VEGFR-3. Estos receptores se clasifican en la familia de receptores de PDGF. Sin embargo, los receptores de VEGF tienen siete bucles de tipo inmunoglobulina en sus dominios extracelulares (a diferencia de cinco en otros miembros de la familia de PDGF) y un inserto quinasa más largo. La expresión de receptores de VEGF se produce fundamentalmente en células endoteliales vasculares, aunque algunos pueden estar presentes, además, en monocitos y en líneas celulares de melanoma. Se ha demostrado que solamente las células endoteliales proliferan en respuesta a VEGF, y las células endoteliales de fuentes diferentes muestran respuestas diferentes. Por lo tanto, las señales mediadas a través de VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 parecen ser específicas del tipo de célula.

15 VEGFR-1 y VEGFR-2 se unen a VEGF 165 con alta afinidad (Kd de aproximadamente 20 pM y 200 pM, respectivamente). El receptor Flk-1 también ha demostrado experimentar autofosforilación en respuesta a VEGF. VEGFR-2 media señales que causan cambios sorprendentes en la morfología, la reorganización de la actina y la alteración de la membrana de células endoteliales aórticas porcinas que sobreexpresan este receptor. En estas células, VEGFR-2 media, además, la quimiotaxis y la mitogenicidad inducidas por ligando; mientras que las células transfectadas con VEGFR-1 carecen de respuestas mitogénicas a VEGF. En contraste, VEGF tiene un fuerte efecto estimulador del crecimiento en células endoteliales sinusoidales de rata que expresan VEGFR-1. Las fosfoproteínas que precipitan junto con VEGFR-1 y VEGFR-2 son distintas, lo que sugiere que moléculas de señalización diferentes interactúan con secuencias intracelulares específicas del receptor.

25 VEGF representa un objetivo para las terapias antitumorales debido a que su expresión se regula positivamente en una variedad de tumores sólidos. VEGF es un regulador principal de la angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. Este proceso es fundamental para el crecimiento de tumores sólidos, que se basa en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Ciertos agentes terapéuticos de molécula pequeña son capaces de dirigirse al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGFR"); dicho direccionamiento por agentes terapéuticos de molécula pequeña puede dar lugar a efectos anticancerígenos. Los agentes dirigidos al receptor de VEGF bloquean indirectamente el crecimiento tumoral, a través de la inhibición de la formación de nuevos vasos. La inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF puede ejercer un efecto antitumoral o antitumoral mejorado sin inhibir significativamente la estimulación por VEGF de macrófagos, osteoclastos o condrocitos.

35 En una modalidad proporcionada en la presente descripción, un antagonista de VEGF es un anticuerpo que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, humano y un anticuerpo humanizado. De acuerdo con una modalidad específica, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab (AVASTIN®). De acuerdo con otra modalidad, el anticuerpo anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab)'2, un Fv monocatenario (scFv), una mitad de anticuerpo, un polipéptido de unión monocatenario, un fragmento Fv, un diacuerpo y un anticuerpo lineal. Por lo tanto, en una modalidad el anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab (LUCENTIS®).

45 Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades de VEGF que incluyen su unión a VEGF o uno o más receptores de VEGF o el ácido nucleico que lo codifica. En algunos casos, el antagonista de VEGF se une a VEGF o un receptor de VEGF. De acuerdo con una modalidad, un antagonista de VEGF se une a VEGF e inhibe la proliferación de células endoteliales inducida por VEGF *in vitro*.

50 De acuerdo con una modalidad, un antagonista de VEGF se une a VEGF o un receptor de VEGF con mayor afinidad que a una molécula que no es VEGF o un receptor que no es de VEGF. De acuerdo con otra modalidad, un antagonista de VEGF se une a VEGF o un receptor de VEGF con una Kd de entre 1 uM y 1 µM. De acuerdo con otra modalidad, el antagonista de VEGF se une a VEGF o un receptor de VEGF entre 500 nM y 1 µM.

55 Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con afinidad y especificidad suficientes. Un anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse como un agente terapéutico dirigido a y que interfiere con enfermedades o afecciones en donde participa la actividad de VEGF. Usualmente un anticuerpo anti-VEGF no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, o a otros factores de crecimiento tales como P1GF, PDGF o bFGF.

60 El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab," también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®," es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con los métodos descritos en Presta y otros. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599. Este contiene regiones marco de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93 % de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, que incluye la mayor parte de las regiones marco, se deriva de IgG1 humana, y aproximadamente 7 % de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 Daltons y se

encuentra glucosilado. Las secuencias de aminoácidos asociadas con la versión monoclonal murina y la humanización de Bevacizumab se proporcionan como las sec. con núm. de ident.: 5-11.

5 En ciertas modalidades, el inhibidor del receptor de VEGF a administrar en una composición de combinación es un inhibidor de molécula pequeña de VEGF. En otras modalidades, el inhibidor del receptor de VEGF a administrar en una composición de combinación es un anticuerpo anti-VEGF. En un ejemplo no limitante, el inhibidor del receptor de VEGF a administrar en una composición de combinación es bevacizumab (AVASTIN®). Las dosis no limitantes, ilustrativas para bevacizumab se discuten en más detalle más abajo y en los ejemplos.

10 Anticuerpos modificados o porciones de estos

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden comprender, además, una porción terapéutica para el uso en aplicaciones terapéuticas.

15 Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, como inmunoconjugados. Como se usa en la presente descripción, para los propósitos de la especificación y las reivindicaciones, inmunoconjugados se refiere a los conjugados que comprenden los anticuerpos antiendoglina quiméricos o fragmentos de estos de acuerdo con la presente invención y al menos una etiqueta terapéutica. Las etiquetas terapéuticas incluyen agentes antitumorales e inhibidores de la angiogénesis. Tales agentes antitumorales se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, toxinas, fármacos, enzimas, citocinas, radionúclidos, agentes fotodinámicos, e inhibidores de la angiogénesis. Las toxinas incluyen, pero no se limitan a, cadena A de ricina, exotoxinas de *Pseudomonas* mutantes, toxoide de difteria, estreptonigrina, boamicina, saporina, gelonina, y proteína antiviral de hierba carmín. Los fármacos incluyen daunorubicina, metotrexato, y caliqueamicinas. Los radionúclidos incluyen radiometales. Las citocinas incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento transformante (TGF)- β , interleucinas, interferones, y factores de necrosis tumoral. Los agentes fotodinámicos incluyen, pero no se limitan a, porfirinas y sus derivados. Etiquetas terapéuticas adicionales se conocerán en la técnica y también se contemplan en la presente descripción. Los métodos para formar complejos del AcM antiendoglina o un fragmento de este con al menos un agente antitumoral se conocen bien por los expertos en la técnica (es decir, conjugados de anticuerpos como se reseña en Ghetie y otros, 1994, *Pharmacol. Ther.* 63:209-34). Tales métodos pueden utilizar uno de varios reactivos heterobifuncionales disponibles usados para acoplar o unir moléculas. En la presente descripción se describen, además, radionúclidos adicionales junto con métodos adicionales para unir moléculas, tales como etiquetas terapéuticas y de diagnóstico.

35 Los anticuerpos pueden modificarse mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica para varios propósitos tales como, por ejemplo, por adición de polietilenglicol (PEG). La modificación con PEG (PEGilación) puede conducir a uno o más de tiempo de circulación mejorado, solubilidad mejorada, resistencia a la proteólisis mejorada, reducción de la antigenicidad e inmunogenicidad, biodisponibilidad mejorada, reducción de la toxicidad, estabilidad mejorada, y formulación más fácil (para una reseña ver, Francis y otros, *International Journal of Hematology* 68:1-18, 1998).

40 Las porciones Fc de los anticuerpos pueden modificarse para aumentar la vida media en circulación en sangre cuando se administran a un paciente. Las modificaciones pueden determinarse mediante el uso de medios convencionales en la técnica tales como, por ejemplo, los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 7,217,798.

45 Se conocen, además, otros métodos para mejorar la vida media de las proteínas de fusión basadas en anticuerpos en circulación tales como, por ejemplo, los descritos en las patentes de Estados Unidos núm. 7,091,321 y 6,737,056. Además, los anticuerpos pueden producirse o expresarse de manera que no contengan fucosa en sus cadenas de azúcares complejas unidas por N-glucósido. Se conoce que la eliminación de la fucosa de las cadenas de azúcares complejas unidas por N-glucósido aumenta las funciones efectoras de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, que incluyen pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). De manera similar, los anticuerpos que pueden unirse a la endoglina pueden unirse en su extremo C-terminal a la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgD e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1, IgG2b, IgG2a, IgG3 e IgG4.

55 Además, los anticuerpos descritos en la presente descripción también pueden modificarse de manera que sean capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Tal modificación de los anticuerpos descritos en la presente descripción permite el tratamiento de enfermedades cerebrales tales como glioblastoma multiforme (GBM). Las modificaciones ilustrativas para permitir que proteínas tales como anticuerpos crucen la barrera hematoencefálica se describen en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 20070082380.

60 La glucosilación de inmunoglobulinas ha demostrado tener efectos significativos sobre sus funciones efectoras, la estabilidad estructural, y la velocidad de secreción de las células productoras de anticuerpos (Leatherbarrow y otros, *Mol. Immunol.* 22:407 (1985)). Los grupos de carbohidrato responsables de estas propiedades generalmente se unen a las regiones constantes (C) de los anticuerpos. Por ejemplo, la glucosilación de IgG en asparagina 297 en el dominio CH2 se requiere para la capacidad completa de IgG de activar la vía clásica de la citólisis dependiente del complemento (Tao y Morrison, *J. Immunol.* 143:2595 (1989)). La glucosilación de IgM en la asparagina 402 en el dominio CH3 es necesaria para el ensamblaje adecuado y la actividad citolítica del anticuerpo (Muraoka y Shulman, *J. Immunol.* 142:695

(1989)). La eliminación de sitios de glucosilación como las posiciones 162 y 419 en los dominios CH1 y CH3 de un anticuerpo IgA condujo a la degradación intracelular y al menos 90 % de inhibición de la secreción (Taylor y Wall, Mol. Cell. Biol. 8:4197 (1988)). Además, los anticuerpos pueden producirse o expresarse de manera que no contengan fucosa en sus cadenas de azúcares complejas unidas por N-glucósido. Se conoce que la eliminación de la fucosa de las cadenas de azúcares complejas unidas por N-glucósido aumenta las funciones efectoras de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, que incluyen pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Estos anticuerpos "desfucosilados" pueden producirse a través de una variedad de sistemas que utilizan técnicas de clonación molecular conocidas en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, animales transgénicos, plantas transgénicas, o líneas celulares que se han modificado genéticamente de manera que ya no contengan las enzimas y vías bioquímicas necesarias para la inclusión de una fucosa en las cadenas de azúcares complejas unidas por N-glucósido (también conocidos como animales, plantas, o células con desactivación de fucosiltransferasa). Los ejemplos no limitantes de células que pueden modificarse genéticamente para ser células con desactivación de fucosiltransferasa incluyen células CHO, células SP2/0, células NS0, y células YB2/0.

Se ha observado, además, la glucosilación de inmunoglobulinas en la región variable (V). Sox y Hood informaron que aproximadamente 20 % de los anticuerpos humanos se encuentran glucosilados en la región V (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66:975 (1970)). Se cree que la glucosilación del dominio V se origina a partir de eventos fortuitos de la señal de N-glucosilación Asn-Xaa-Ser/Thr en la secuencia de la región V y no se ha reconocido en la técnica que esto repercuta en la función de las inmunoglobulinas.

La glucosilación en un residuo de marco del dominio variable puede alterar la interacción de unión del anticuerpo con el antígeno. La presente invención incluye los criterios por los cuales un número limitado de aminoácidos en el marco o las CDR de una cadena de inmunoglobulina quimérica se eligen para su mutación (por ejemplo, por sustitución, eliminación, o adición de residuos) para aumentar la afinidad de un anticuerpo.

La afinidad de unión a un antígeno puede modularse, generalmente, mediante la introducción de una o más mutaciones en el marco de la región V, típicamente en áreas adyacentes a una o más CDR y/o en una o más regiones marco. Típicamente, tales mutaciones involucran la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas que pueden destruir o crear las secuencias del sitio de glucosilación pero no afectan sustancialmente las propiedades estructurales hidropáticas del polipéptido. Típicamente, se evitan las mutaciones que introducen un residuo de prolina. La glucosilación de anticuerpos se describe, además, en la patente de Estados Unidos núm. 6,350,861.

Los anticuerpos pueden formularse para el suministro a corto plazo o el suministro prolongado (a largo plazo).

Los anticuerpos que se unen a la endoglina pueden usarse, además, para la purificación de la endoglina y/o para detectar los niveles de endoglina en una muestra o un paciente para detectar o diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con la endoglina como se describe en más detalle más abajo.

Los anticuerpos quiméricos que se unen a la endoglina generados mediante el uso de tales métodos pueden probarse para uno o más de afinidad de unión, avidéz, y capacidades neutralizantes. Los anticuerpos quiméricos útiles pueden usarse para administrarlos a un paciente para prevenir, inhibir, controlar o tratar una afección enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis.

Los anticuerpos pueden evaluarse para uno o más de afinidad de unión, velocidades de asociación, velocidades de disociación y avidéz. En un aspecto, los anticuerpos pueden evaluarse para determinar su capacidad de neutralizar la actividad de la endoglina o el VEGF. La medición de la afinidad de unión, las velocidades de asociación, las velocidades de disociación y la avidéz puede realizarse mediante el uso de ensayos reconocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), análisis de Scatchard, análisis BIACORE (resonancia de plasmones superficiales), etc., así como otros ensayos comúnmente usados y conocidos para los expertos en la técnica.

La medición de la unión de los anticuerpos a la endoglina y/o la capacidad de los anticuerpos, por ejemplo, de inhibir la angiogénesis, puede determinarse mediante el uso, por ejemplo, de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de unión competitiva, un ensayo ELISPOT, o cualquier otro ensayo útil conocido en la técnica. Estos ensayos se usan comúnmente y se conocen bien por los expertos en la técnica.

En una modalidad no limitante, puede usarse un ensayo ELISA para medir la capacidad de unión de anticuerpos específicos que se unen a la endoglina.

Los ensayos, tales como un ELISA, pueden usarse, además, para identificar anticuerpos de estos que pueden exhibir aumento de la especificidad por la endoglina en comparación con otros anticuerpos de estos. Los ensayos, tales como un ELISA, pueden usarse, además, para identificar anticuerpos de estos con unión a epítomos en uno o más polipéptidos y en una o más especies de endoglina o VEGF. El ensayo de especificidad puede realizarse mediante la ejecución de ELISA paralelos en los que los anticuerpos de prueba se tamizan simultáneamente en cámaras de ensayo independientes para determinar la capacidad de unión a uno o más epítomos en diferentes especies del polipéptido que

contiene los epítomos de endoglina para identificar anticuerpos de estos que se unen a la endoglina. Otra técnica para medir la afinidad de unión aparente familiar para los expertos en la técnica es una técnica de resonancia de plasmones superficiales (analizada en un sistema BIACORE 2000) (Liljeblad, y otros, Glyco. J. 2000, 17:323-329). Las mediciones estándar y los ensayos de unión tradicionales se describen en Heeley, R. P., Endocr. Res. 2002,28:217-229.

5 Los anticuerpos quiméricos para endoglina pueden ensayarse, además, para determinar su capacidad de tratar varias enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis junto con varias formas de cáncer (por ejemplo, tumores primarios, tumores recurrentes, y metástasis). Cualquier ensayo adecuado conocido para un experto en la técnica puede usarse para monitorear tales efectos. Varias de estas técnicas se describen en la presente descripción. En un ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente descripción se ensayan para determinar su capacidad de unión a la endoglina. En otro ejemplo, las constantes de afinidad para los anticuerpos descritos en la presente descripción se determinan por resonancia de plasmones superficiales (SPR). Aún en otro ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente descripción se ensayan para determinar su efecto sobre la inhibición de la angiogénesis.

15 II. Composiciones

Cada uno de los compuestos descritos en la presente descripción puede usarse como una composición cuando se combina con un portador o excipiente aceptable. Tales composiciones son útiles para el análisis *in vitro* o *in vivo* o para su administración a un sujeto *in vivo* o *ex vivo* para tratar a un sujeto con los compuestos descritos.

20 En la presente descripción se proporcionan composiciones (medicamentos) que contienen un anticuerpo antiendoglina quimérico capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de la endoglina, tales como la actividad angiogénica.

25 En la presente descripción se proporcionan composiciones (medicamentos) que contienen un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de VEGF, tales como su actividad mitogénica en una modalidad, o su actividad angiogénica.

30 En la presente descripción se proporcionan, además, composiciones (medicamentos) que contienen una combinación de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este).

35 Las composiciones que contienen un anticuerpo antiendoglina quimérico pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con una composición que contiene un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este). Tales administraciones incluyen, pero no se limitan a, la administración dentro de aproximadamente cuatro semanas una de otra, dentro de aproximadamente tres semanas una de otra, dentro de aproximadamente dos semanas una de otra, dentro de aproximadamente una semana una de otra, dentro de un día una de otra, dentro de aproximadamente 12 horas una de otra, dentro de aproximadamente 6 horas una de otra, dentro de aproximadamente 3 horas una de otra, dentro de aproximadamente 1 hora una de otra, dentro de aproximadamente 30 minutos una de otra, en el mismo día, al mismo tiempo, o una combinación de estos. Cuando se contemplan múltiples dosis de la composición de la presente invención y/o la porción terapéutica combinada, se entiende que las dosis de cada una pueden determinarse empíricamente mediante el uso de dosis y concentraciones conocidas en base a la edad, la altura, el peso, la salud y otras características físicas de un sujeto mediante el uso de estándares de productos disponibles en el mercado.

45 Cuando las composiciones se administran secuencialmente, una composición que comprende un anticuerpo antiendoglina quimérico descrito en la presente descripción puede administrarse, por ejemplo, antes y/o después de un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este). Alternativamente, una composición que comprende un anticuerpo antiendoglina quimérico descrito en la presente descripción se administra después de un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este).

50 Cuando las composiciones se administran simultáneamente, una composición que contiene un anticuerpo antiendoglina quimérico puede administrarse en el mismo sitio, o en un sitio diferente al de una composición que contiene un anticuerpo anti-VEGF.

55 Aún en otra modalidad, en la presente descripción se proporcionan composiciones (medicamentos) que contienen un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este), capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de la endoglina y el VEGF, respectivamente, tales como actividad mitogénica, proliferación celular, crecimiento tumoral, neovascularización, o actividad angiogénica.

60 Se entenderá que los regímenes de tratamiento pueden incluir una o más administraciones de cada una de las composiciones descritas en la presente descripción. Una composición puede administrarse en una dosis única o dosis múltiples. La administración de composiciones independientes puede ser por la misma vía o por vías diferentes.

65 En una modalidad, una composición se administra cada una a tres semanas por seis a 12 ciclos o hasta la progresión del tumor. El método puede incluir, además, la etapa de administrar una composición cada una a doce semanas hasta dos años. En otro ejemplo no limitante, la administración simultánea de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) se produce en la semana 1, seguido de la

administración adicional de las composiciones en la semana uno, dos, tres o cuatro, en donde la administración simultánea se repite por seis a doce ciclos o hasta la progresión del tumor y seguido de la administración de las composiciones cada una a doce semanas hasta dos años.

5 En un ejemplo de tratamiento para el cáncer en un paciente descrito en la presente descripción, el tratamiento incluye la eliminación quirúrgica del cáncer y la administración de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) en una a tres semanas durante 12 meses o hasta la progresión del tumor seguido de la administración simultánea de un anticuerpo antiendoglina y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) en una dosis en una a 12 semanas. Además, la administración simultánea de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) puede repetirse cada una a tres semanas hasta 6 ciclos. Opcionalmente, el método incluye, además, administrar un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) cada una a doce semanas hasta dos años. Se entenderá que los regímenes de tratamiento pueden combinarse con los métodos de monitoreo proporcionados en la presente descripción para determinar si, y cuándo, es necesario administrar dosis adicionales de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este).

La terapia de combinación puede proporcionar un efecto sinérgico y/o beneficioso o puede permitir dosis más bajas de una combinación para proporcionar un margen de seguridad mayor. La invención incluye protocolos de tratamiento que aumentan el efecto profiláctico o terapéutico de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) para la prevención, control, tratamiento o ablación del cáncer u otras enfermedades.

En una modalidad, un tratamiento terapéutico adicional tal como, por ejemplo, un inhibidor de la angiogénesis (como se describe en la presente descripción) se administra a un sujeto. La composición que contiene un tratamiento terapéutico adicional de este tipo puede administrarse en combinación (ya sea secuencialmente o simultáneamente) con las otras composiciones descritas en la presente descripción.

En un tratamiento para el cáncer proporcionado en la presente descripción, un tratamiento terapéutico adicional incluye la eliminación quirúrgica del cáncer, irradiación, uno o más agentes quimioterapéuticos, o una combinación de estos, y la administración simultánea de una o más composiciones descritas en la presente descripción. En un aspecto, la administración de una composición puede ser, por ejemplo, una infusión intravenosa de 20 minutos.

Por lo tanto las composiciones pueden incluir, además del ingrediente activo, un excipiente, portador, amortiguador, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del uno o más ingredientes activos. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración.

Las formulaciones que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, identificados por los métodos descritos en la presente descripción pueden prepararse para su almacenamiento mediante la mezcla de la proteína que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizantes aceptables son aquellos que no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen 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 con metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

Los portadores aceptables son fisiológicamente aceptables para el paciente al que se administran y retienen las propiedades terapéuticas de los compuestos con/en los cuales estos se administran. Los portadores aceptables y sus formulaciones se encuentran y generalmente se describen en, por ejemplo, Remington' pharmaceutical Sciences (18va Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990). Un portador ilustrativo es solución salina fisiológica. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente descripción significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación, involucrado en portar o transportar los compuestos en cuestión desde el sitio de administración de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo, o en un sistema de ensayo *in vitro*. Cada portador es "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para un sujeto al cual se administra. Un portador aceptable tampoco debe alterar la actividad específica de los compuestos en cuestión.

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables que incluyen solventes (acuosos o no acuosos), soluciones, emulsiones, medios de

dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y promotores o de retraso de la absorción, compatibles con la administración. Composiciones o formulaciones, por lo tanto, se refieren a una composición adecuada para el uso diagnóstico y/o terapéutico en un sujeto. Las composiciones y formulaciones incluyen una cantidad de un compuesto descrito en la presente descripción y un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

5

Las composiciones pueden formularse de manera que sean compatibles con una vía de administración particular (es decir, sistémica o local). Por lo tanto, las composiciones incluyen portadores, diluyentes, o excipientes adecuados para la administración por varias vías.

10

En otra modalidad, las composiciones pueden comprender, además, si es necesario, un aditivo aceptable para mejorar la estabilidad de los compuestos en la composición y/o para controlar la velocidad de liberación de la composición. Los aditivos aceptables no alteran la actividad específica de los compuestos en cuestión. Los aditivos aceptables ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un azúcar tal como manitol, sorbitol, glucosa, xilitol, trehalosa, sorbosa, sacarosa, galactosa, dextrano, dextrosa, fructosa, lactosa y mezclas de estos. Los aditivos aceptables pueden combinarse con portadores y/o excipientes aceptables tales como dextrosa. Alternativamente, los aditivos aceptables ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un surfactante tal como polisorbato 20 o polisorbato 80 para aumentar la estabilidad del péptido y disminuir la gelificación de la solución. El surfactante puede añadirse a la composición en una cantidad de 0,01 % a 5 % de la solución. La adición de tales aditivos aceptables aumenta la estabilidad y la vida media de la composición en el almacenamiento.

15

20

Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por inyección, que incluye, pero no se limita a, inyección subcutánea, intravítrea, intradérmica, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o intramuscular. Los excipientes y portadores para el uso en la formulación de composiciones para cada tipo de inyección se contemplan en la presente descripción. Las descripciones siguientes son como ejemplo solamente y no pretenden limitar el alcance de las composiciones. Las composiciones para inyección incluyen, por ejemplo, soluciones o dispersiones acuosas (solubles en agua), y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio pueden incluirse en la composición. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para el uso como tal, o liofilizarse; la preparación liofilizada puede combinarse después con una solución estéril antes de su administración. Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad, y estabilidad adecuados. Aquellos con experiencia relevante en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas mediante el uso de, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro de sodio para inyección, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, amortiguadores, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un ingrediente activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del ingrediente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de este previamente esterilizada por filtración.

25

30

35

40

45

50

Las composiciones pueden administrarse convencionalmente por vía intravítrea, subcutánea, o por medio de implante intravítreo.

55

Las composiciones pueden administrarse convencionalmente por vía intravenosa, tal como mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. Para la inyección, un ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está sustancialmente libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las soluciones adecuadas pueden prepararse mediante el uso, por ejemplo, de vehículos isotónicos tales como cloruro de sodio para inyección, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, amortiguadores, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Además, las composiciones pueden administrarse por medio de aerosolización. (Lahn y otros, *Aerosolized Anti-T-cell-Receptor Antibodies Are Effective against Airway Inflammation and Hyperreactivity*, Int. Arch. Allergy Immuno., 134: 49-55 (2004)).

60

65

En una modalidad, la composición se liofiliza, por ejemplo, para aumentar la vida en estante en el almacenamiento. Cuando las composiciones se consideran para el uso en medicamentos o cualquiera de los métodos proporcionados en la presente descripción, se contempla que la composición puede estar sustancialmente libre de pirógenos de manera que la composición no causará una reacción inflamatoria o una reacción alérgica peligrosa cuando se administra a un

paciente humano. La prueba de las composiciones para detectar pirógenos y la preparación de composiciones sustancialmente libres de pirógenos se entienden bien por un experto en la técnica y pueden realizarse mediante el uso de estuches disponibles en el mercado.

5 Los portadores aceptables pueden contener un compuesto que estabiliza una composición, aumenta o retrasa la absorción, o aumenta o retrasa la depuración. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, o dextranos; proteínas de bajo peso molecular; composiciones que reducen la depuración o la hidrólisis de péptidos; o excipientes u otros estabilizantes y/o amortiguadores. Las composiciones que pueden retrasar la absorción incluyen, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Pueden usarse, además, detergentes para
10 estabilizar o aumentar o disminuir la absorción de las composiciones, que incluyen portadores liposomales. Para proteger contra la digestión el compuesto puede formar complejos con una composición para hacerlo resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, o el compuesto puede formar complejos en un portador apropiadamente resistente tal como un liposoma. Los medios para proteger los compuestos contra la digestión se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Fix (1996) Pharm Res. 13:1760 1764; Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol. 48:119 135; y la patente de Estados Unidos núm. 5,391,377, que describe composiciones lipídicas para el suministro por vía oral de agentes
15 terapéuticos).

La frase "farmacéuticamente aceptables" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen una reacción alérgica o adversa similar, tal como malestar gástrico, mareo y
20 similares, cuando se administran a un sujeto.

El término "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente distintas adecuadas como dosis unitarias para sujetos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, portador,
25 o vehículo.

Las composiciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema inmunológico del sujeto de utilizar el ingrediente activo, y el grado de capacidad de unión deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo requerido a administrar dependen del criterio del especialista y son peculiares para cada individuo. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las inyecciones de refuerzo también son variables, pero se tipifican por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se contemplan las infusiones intravenosas continuas
30 suficientes para mantener las concentraciones en la sangre.

Una modalidad contempla el uso de las composiciones descritas en la presente descripción para producir un medicamento para tratar una afección, enfermedad o trastorno descrito en la presente descripción. Los medicamentos pueden formularse en base a las características físicas del paciente/sujeto que necesita tratamiento, y pueden formularse en forma de formulaciones únicas o múltiples en base al estadio de la afección, enfermedad o trastorno. Los
40 medicamentos pueden envasarse en un envase adecuado con etiquetas apropiadas para la distribución a hospitales y clínicas en donde la etiqueta es para la indicación de tratar a un sujeto que tiene una enfermedad descrita en la presente descripción. Los medicamentos pueden envasarse como unidades individuales o múltiples. Las instrucciones para la dosis y administración de las composiciones pueden incluirse con los envases como se describe más abajo. La presente solicitud se dirige a medicamentos de un anticuerpo antiendoglina quimérico descrito anteriormente en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, la presente solicitud se dirige a
45 medicamentos de un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) descrito anteriormente en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Aún en otra modalidad, la presente solicitud se dirige a medicamentos de un anticuerpo antiendoglina quimérico y un anticuerpo anti-VEGF (o fragmento de unión al antígeno de este) descritos anteriormente en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.
50

En una modalidad de la presente invención, las composiciones se formulan libres de pirógenos de manera que sean aceptables para la administración a pacientes humanos. La prueba de las composiciones para detectar pirógenos y la preparación de composiciones libres de pirógenos se entienden bien por un experto en la técnica.

55 Una modalidad de la presente invención contempla el uso de cualquiera de las composiciones de la presente invención para producir un medicamento para tratar un trastorno de la presente invención. Los medicamentos pueden formularse en base a las características físicas del paciente/sujeto que necesita tratamiento, y pueden formularse en forma de formulaciones únicas o múltiples en base al trastorno. Los medicamentos pueden envasarse en un envase adecuado con etiquetas apropiadas para la distribución a hospitales y clínicas en donde la etiqueta es para la indicación de tratar
60 un trastorno como se describe en la presente descripción en un sujeto. Los medicamentos pueden envasarse como unidades individuales o múltiples. Las instrucciones para la dosis y administración de las composiciones pueden incluirse con los envases.

65 III. Métodos de uso

En la presente descripción se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo quimérico que se une

preferentemente a la endoglina y un anticuerpo anti-VEGF antagonista para el uso en el tratamiento de un sujeto (humano o no humano). En ciertos casos, los usos incluyen administrar a un sujeto una sola composición que contiene tanto un anticuerpo antiendoglina quimérico como un anticuerpo anti-VEGF. En otros casos, los usos incluyen administrar a un sujeto una sola composición que contiene tanto un anticuerpo antiendoglina quimérico como ranibizumab. En otros casos, los usos incluyen administrar a un sujeto una sola composición que contiene tanto un anticuerpo antiendoglina quimérico como ranibizumab.

Una respuesta eficaz de la presente invención se logra cuando el sujeto experimenta alivio o reducción parcial o total de los signos o síntomas de la enfermedad, e incluye específicamente, sin limitación, la prolongación de la supervivencia. Los tiempos de supervivencia libre de progresión esperados pueden medirse en meses a años, en dependencia de los factores de pronóstico que incluyen el número de recaídas, el estadio de la enfermedad, y otros factores. La prolongación de la supervivencia incluye sin limitación tiempos de al menos 1 mes, aproximadamente al menos 2 meses, aproximadamente al menos 3 meses, aproximadamente al menos 4 meses, aproximadamente al menos 6 meses, aproximadamente al menos 1 año, aproximadamente al menos 2 años, aproximadamente al menos 3 años, aproximadamente al menos 4 años, aproximadamente al menos 5 años, etc. La supervivencia general o libre de progresión también puede medirse en meses a años. Alternativamente, una respuesta eficaz puede ser que los síntomas o la carga cancerosa del sujeto se mantengan sin cambios y no empeoren. Las indicaciones adicionales de tratamiento de indicaciones se describen en más detalle más abajo.

Las composiciones de anticuerpos descritas en la presente descripción pueden usarse como agentes no terapéuticos (por ejemplo, como agentes de purificación por afinidad). Generalmente, en una modalidad de este tipo, una proteína de interés se inmoviliza en una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, mediante el uso de métodos convencionales conocidos en la técnica. La proteína inmovilizada se pone en contacto con una muestra que contiene el objetivo de interés (o fragmento de este) a purificar, y después de eso el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína objetivo, que se encuentra unida al anticuerpo inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro solvente adecuado, tal como amortiguador de glicina, pH 5,0, lo que liberará la proteína objetivo. Además de la purificación, las composiciones pueden usarse para la detección, el diagnóstico y la terapia de enfermedades y trastornos asociados con la endoglina, el VEGF y la angiogénesis.

El término "poner en contacto" como se usa en la presente descripción se refiere a añadir una solución o composición de un compuesto junto con un medio líquido que baña los polipéptidos, células, tejido u órgano de un organismo. Alternativamente, "poner en contacto" se refiere a mezclar una solución o composición de un compuesto, junto con un líquido tal como sangre, suero, o plasma derivado de un organismo. Para las aplicaciones *in vitro*, una composición puede comprender, además, otro componente, tal como dimetil sulfóxido (DMSO). El DMSO facilita la captación de los compuestos o la solubilidad de los compuestos. La solución que comprende el compuesto de prueba puede añadirse al medio que baña las células, tejidos, u órganos, o mezclarse con otro líquido tal como sangre, mediante la utilización de un aparato de suministro, tal como un dispositivo basado en pipeta o un dispositivo basado en jeringa. Para las aplicaciones *in vivo*, el contacto puede producirse, por ejemplo, por medio de la administración de una composición a un paciente mediante cualquier medio adecuado; las composiciones con excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables se han descrito en más detalle anteriormente.

Un "sujeto" o "paciente" (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un animal no humano tal como un primate, roedor, vaca, caballo, cerdo, oveja, camello, llama, etc.) puede ser un mamífero que exhibe una o más manifestaciones y/o síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno descrito en la presente descripción. En ciertas situaciones, un sujeto puede ser asintomático y aun así tener manifestaciones clínicas de la enfermedad o trastorno. Un anticuerpo puede conjugarse a una porción terapéutica o puede ser una proteína de fusión que contiene una porción terapéutica. Un anticuerpo puede conjugarse a una porción detectable o puede ser una proteína de fusión que contiene una porción detectable. En una modalidad, el anticuerpo puede conjugarse tanto a una porción terapéutica como a una porción detectable. Un anticuerpo puede conjugarse a, o modificarse de manera recombinante con, una etiqueta de afinidad (por ejemplo, una etiqueta de purificación). Las etiquetas de afinidad tales como, por ejemplo, las etiquetas de His6, avidina, etc. son convencionales en la técnica.

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos o fragmentos de estos de manera que pueden conjugarse o unirse a una porción terapéutica y/o una porción visualizable o detectable y/o una etiqueta de afinidad. Los métodos para conjugar o unir polipéptidos se conocen bien en la técnica. Las asociaciones (uniones) entre compuestos y etiquetas incluyen cualquiera de los medios conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, interacciones covalentes y no covalentes, conjugación química así como técnicas recombinantes.

"Angiogénesis" se usa en la presente descripción para incluir todos los aspectos del mantenimiento y desarrollo de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, la angiogénesis incluye la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares (ya sea de novo o a partir de vasos preexistentes) que conduce a la neovascularización así como al mantenimiento y control de la vasculatura existente y los vasos sanguíneos pequeños. La angiogénesis es un proceso complejo que incluye una serie de etapas secuenciales que incluyen la degradación mediada por células endoteliales de la membrana basal vascular y las matrices intersticiales, la migración de células endoteliales, la proliferación de células endoteliales, y la formación de bucles capilares por células endoteliales. La angiogénesis incluye el crecimiento y/o desarrollo de nuevos vasos

sanguíneos (también referido como neovascularización), la dilatación de los vasos pequeños, el crecimiento vascular excesivo o prolongado, y el mantenimiento de la vasculatura existente.

5 El término "enfermedad asociada con la angiogénesis" se usa en la presente descripción, para los propósitos de la especificación y las reivindicaciones, para referirse a ciertos procesos patológicos en seres humanos en los que la angiogénesis se prolonga anormalmente. Esto incluye, además, las afecciones y enfermedades de la angiogénesis, tales como aquellas enfermedades y afecciones relacionadas con, causadas por, o asociadas con la angiogénesis. Los ejemplos no limitantes de tales enfermedades incluyen varias formas de cánceres y metástasis, degeneración macular, CNV, retinopatía diabética, o vitreorretinopatía proliferativa. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar una enfermedad asociada con la angiogénesis mediante su unión a la endoglina e inhibición de la angiogénesis.

15 El término "terapia antiangiogénica" se usa en la presente descripción para referirse a la terapia dirigida a células y/o vasculatura que expresa endoglina (expresada a niveles más altos en la vasculatura en proliferación en comparación con la vasculatura inactiva); este incluye, además, la terapia dirigida contra la angiogénesis (es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares que conduce a la neovascularización), la terapia dirigida contra la vasculatura existente y/o la vascularización o crecimiento excesivo de los vasos sanguíneos, la terapia dirigida hacia la dilatación de vasos pequeños, y la terapia dirigida a una enfermedad o afección (por ejemplo, terapia dirigida a la vasculatura). Las enfermedades o afecciones ilustrativas contempladas dentro de la invención incluyen, pero no se limitan a, varias formas de cáncer y metástasis.

25 Los términos "recurrencia," "recaída" o "en recaída" se refieren al regreso de un cáncer o enfermedad después de la evaluación clínica de la desaparición de la enfermedad. Un diagnóstico de metástasis a distancia o recurrencia local puede considerarse una recaída.

30 El término "terapia de mantenimiento" se refiere al retratamiento programado que se proporciona para ayudar a mantener los efectos de un tratamiento previo. La terapia de mantenimiento se proporciona frecuentemente para ayudar a mantener el cáncer en remisión o prolongar una respuesta a una terapia específica independientemente de la progresión de la enfermedad.

35 El término "supervivencia libre de progresión" en oncología se refiere a la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento que un cáncer no crece. La supervivencia libre de progresión incluye la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado enfermedad estable.

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones de la invención para el uso en la prevención o tratamiento de un cáncer o una metástasis en un sujeto. Un paciente de este tipo puede ser sintomático o asintomático.

40 En algunos casos, la administración de la composición prolonga la vida del paciente tratado, reduce el volumen tumoral, elimina un tumor, disminuye la proliferación celular, aumenta la apoptosis de células tumorales, o una combinación de estos.

45 Si es necesario, los usos pueden incluir, además, la eliminación quirúrgica del cáncer y/o la administración de un agente o tratamiento anticancerígeno adicional. Los agentes anticancerígenos se han proporcionado en otra parte en la presente descripción.

50 En un aspecto, los síntomas del paciente que padece de cáncer mejoran. La mejora puede manifestarse como, por ejemplo, reducción del dolor, reducción del tamaño tumoral, eliminación de tumores, prevención de aumentos del tamaño tumoral o la progresión o de la enfermedad, prevención de la formación de metástasis, o inhibición del crecimiento metastásico, o una combinación de estos.

55 En un aspecto, la administración de las composiciones reduce o elimina la necesidad de que el paciente se someta a cirugía o tratamiento con uno o más agentes o tratamientos anticancerígenos adicionales.

Tratamiento con anticuerpos antiendoglina quiméricos y agentes anti-VEGF

60 En la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en la prevención o tratamiento de una o más enfermedades o trastornos asociados con la angiogénesis/neovascularización, la vascularización excesiva, el crecimiento tumoral, la proliferación de células tumorales o la dilatación de vasos pequeños, las composiciones que contienen un anticuerpo antiendoglina quimérico y una composición que contiene un anticuerpo anti-VEGF. Estas pueden ser para la administración al mismo tiempo o en momentos diferentes, para de este modo prevenir, tratar, mejorar, o atenuar la enfermedad o su gravedad.

65 Como se usa en la presente descripción, "prevención" se refiere a profilaxis, prevención de la aparición de síntomas, prevención de la progresión de una enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis o correlacionado con la

actividad de la endoglina. Como se usa en la presente descripción, "inhibición," "tratamiento" y "tratar" se usan indistintamente y se refieren, por ejemplo, a detención de los síntomas, prolongación de la supervivencia, mejora parcial o completa de los síntomas, y erradicación parcial o completa de un tumor o metástasis.

5 Las composiciones pueden administrarse a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz que es eficaz para producir cierto efecto terapéutico deseado mediante la inhibición de una enfermedad o trastorno a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Para la administración de las presentes composiciones a pacientes humanos, las composiciones pueden formularse mediante metodologías conocidas por un experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que logra al menos parcialmente un efecto
10 terapéutico o profiláctico deseado en un órgano o tejido. La cantidad de un anticuerpo antiendoglina quimérico o un anticuerpo anti-VEGF necesaria para lograr la prevención y/o tratamiento terapéutico de una enfermedad o trastorno no es fija per se. La cantidad de anticuerpo administrada puede variar con el tipo de enfermedad, la extensión de la enfermedad, y el tamaño del mamífero que padece la enfermedad o trastorno. En una modalidad, dos anticuerpos descritos en la presente descripción se administran a un paciente en combinación como se describió anteriormente. La
15 administración en combinación puede referirse a la administración en una sola composición o en composiciones independientes.

En la presente descripción "administrar" se refiere como proporcionar una o más composiciones a un paciente de una manera que da lugar a que la composición esté dentro del cuerpo del paciente. Una administración de este tipo puede
20 ser por cualquier vía que incluye, sin limitación, localmente, regionalmente o sistémicamente mediante administración subcutánea, intravítrea, intradérmica, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o intramuscular (por ejemplo, inyección).

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo
25 de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular empleado, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con la composición particular empleada, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
30

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden administrarse a un sujeto en varias cantidades de dosis y en varios intervalos de tiempo. Las dosis no limitantes incluyen aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, o cualquier número entero intermedio. Además, la o las dosis de un anticuerpo pueden administrarse dos veces por semana, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas, cada 4 semanas, cada 6 semanas, cada 8 semanas, cada 12 semanas, o cualquier combinación de semanas de estas. Se contemplan, además, ciclos de dosificación tales como, por ejemplo, administrar anticuerpos una o dos veces por semana durante 2, 3, 4, 5 o 6 semanas, seguido de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 semanas sin terapia. Alternativamente, en dependencia de la respuesta de un sujeto a la terapia, el tiempo de entre tratamientos puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Ciclos de dosificación adicionales que incluyen, por ejemplo, diferentes combinaciones de las dosis y ciclos semanales descritos en la presente descripción también se contemplan dentro de la invención.
40

45 "Poner en contacto" se define en la presente descripción como un medio para poner una composición como se proporciona en la presente descripción en proximidad física con una célula, órgano, tejido o fluido como se describe en la presente descripción. Poner en contacto incluye la administración sistémica o local de cualquiera de las composiciones proporcionadas en la presente descripción e incluye, sin limitación, procedimientos y métodos in vitro, in vivo y/o ex vivo. "Combinar" y "poner en contacto" se usan indistintamente en la presente descripción y se definen de la misma manera.
50

Un médico o veterinario puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz (ED50) de la composición requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos empleados en la composición a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que el efecto deseado se logre. Alternativamente, una dosis puede mantenerse constante.
55

Las composiciones pueden administrarse a un paciente por cualquier vía conveniente tal como se describió anteriormente. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones, se formulan en formas de dosificación aceptables tales como las descritas más abajo o por otros métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica.
60

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos pueden determinarse mediante procedimientos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de LD50/ED50. Si bien
65

pueden usarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tomarse la precaución de diseñar un sistema de suministro que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células sanas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

5 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y/o estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosis para el uso en seres humanos. La dosis de estos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima) como se determina en cultivo celular. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Esta información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Las composiciones que contienen combinaciones de compuestos también pueden evaluarse mediante el uso de cualquiera de estos métodos.

En una modalidad, la invención contempla la inhibición de la angiogénesis en un tejido. La extensión de la angiogénesis en un tejido y, por lo tanto, la extensión de la inhibición lograda pueden evaluarse mediante una variedad de métodos, tales como los descritos en la presente descripción.

20 La especificidad única de los anticuerpos que reconocen (por ejemplo, se unen preferentemente a) endoglina o VEGF e inhiben la angiogénesis, proporciona los usos diagnóstico y terapéutico para enfermedades caracterizadas por angiogénesis (neovascularización), dilatación de vasos pequeños, vascularización excesiva, proliferación de células tumorales, y/o crecimiento tumoral. Los anticuerpos pueden administrarse a un sujeto que padece de varias formas de cáncer (tumores primarios y metástasis).

Se entenderá que, además de la administración de las composiciones descritas en la presente descripción, en la presente descripción se contempla que un sujeto puede tratarse, además, con uno o más inhibidores de la angiogénesis adicionales.

30 El término "inhibidor de la angiogénesis" se usa en la presente descripción, para los propósitos de la especificación y las reivindicaciones, para referirse a un compuesto o molécula que incluye, pero no se limita a, péptidos, proteínas, enzimas, polisacáridos, oligonucleótidos, ADN, ARN, vectores recombinantes, y fármacos cuya función es inhibir la angiogénesis. Los inhibidores de la angiogénesis se conocen en la técnica y todos los tipos se contemplan en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de compuestos y moléculas incluyen biomoléculas naturales y sintéticas tales como paclitaxel, O-(cloroacetil-carbomil) fumagilol ("TNP-470" o "AGM 1470"), trombospondina-1, trombospondina-2, angiostatina, inhibidor de la angiogénesis derivado de condrocitos humanos ("hCHIAMP"), inhibidor angiogénico derivado de cartílago, factor 4 plaquetario, gro-beta, proteína 10 inducible por interferón humano ("IP10"), interleucina 12, Ro 318220, triciclodecán-9-il xantato ("D609"), irsogladina, bromuro de 8,9-dihidroxi-7-metil-benzo[b] quinolizino ("GPA 1734"), medroxiprogesterona, una combinación de heparina y cortisona, inhibidores de glucosidasas, genisteína, talidomida, diaminoantraquinona, herbimicina, ácido ursólico, y ácido oleanólico. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen los dirigidos hacia moléculas tales como VEGF, receptor de VEGF, o diferentes epítopos de la endoglina. Además, los inhibidores de molécula pequeña del receptor de VEGF se conocen y se contemplan en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen ranibizumab (Lucentis), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (Sutent), sorafenib (Nexavar), axitinib, pegaptanib y pazopanib.

50 Un ejemplo de un inhibidor del receptor de VEGF es ranibizumab. Las dosis oculares ilustrativas para ranibizumab incluyen aproximadamente 0,5 mg, administrados mensualmente por vía intravítrea. Otro ejemplo de un inhibidor del receptor de VEGF es VEGF-Trap. Las dosis ilustrativas para VEGF-Trap incluyen aproximadamente 0,5 - aproximadamente 10 mg/kg administrados cada 2 o 3 semanas. Las dosis oculares ilustrativas para VEGF-Trap incluyen aproximadamente 0,5 - aproximadamente 2,0 mg administrados por vía intravítrea mensualmente o cuatrimestralmente.

55 Los regímenes ilustrativos para sunitinib incluyen aproximadamente 50 mg administrados durante 4 semanas, seguido de 2 semanas sin fármaco. Los regímenes de tratamiento pueden repetirse de forma cíclica o acíclica. Las dosis ilustrativas para sorafenib incluyen aproximadamente 400 mg administrados diariamente. Las dosis ilustrativas para axitinib incluyen aproximadamente 3, aproximadamente 5, o aproximadamente 10 mg administrados dos veces al día. Las dosis ilustrativas para pegaptanib incluyen aproximadamente 0,3- aproximadamente 3 mg administrados por vía intravítrea cada 6 semanas. Las dosis ilustrativas para pazopanib incluyen aproximadamente 200 - aproximadamente 1000 mg administrados diariamente.

65 Múltiples combinaciones de estos inhibidores del receptor de VEGF pueden administrarse con las composiciones descritas en la presente descripción. En una modalidad, las combinaciones pueden dar lugar al uso de dosis más bajas para los anticuerpos descritos o la unión al antígeno. Tales alteraciones en la dosificación pueden ser el resultado de los efectos sinérgicos de las combinaciones de los anticuerpos.

Cáncer

CD105 se asocia con la angiogénesis tumoral y tiene una regulación positiva fuerte en el endotelio de varios tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales. CD105 se regula positivamente en una amplia variedad de endotelios tumorales. Además, existe una expresión de CD105 en el endotelio tumoral más fuerte que en los tejidos normales correspondientes. Por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis con anticuerpos antiendoglina quiméricos representa una opción de tratamiento para tumores cancerosos. Las composiciones descritas en la presente descripción pueden usarse para tratar tumores cancerosos y metástasis. Las composiciones pueden usarse, además, en las formulaciones de medicamentos para el tratamiento de tumores cancerosos y metástasis.

VEGF representa un objetivo para las terapias antitumorales debido a que su expresión se regula positivamente en una variedad de tumores sólidos. VEGF es un regulador principal de la angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. Este proceso es fundamental para el crecimiento de tumores sólidos, que se basa en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Ciertos agentes terapéuticos de molécula pequeña son capaces de dirigirse al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGFR"); dicho direccionamiento por agentes terapéuticos de molécula pequeña puede dar lugar a efectos anticancerígenos. Los agentes dirigidos al receptor de VEGF bloquean indirectamente el crecimiento tumoral, a través de la inhibición de la formación de nuevos vasos. La inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF puede ejercer un efecto antitumoral o antitumoral mejorado sin inhibir significativamente la estimulación por VEGF de macrófagos, osteoclastos o condrocitos.

El término "tumor" se usa en la presente descripción para referirse a un tejido canceroso que expresa endoglina y/o VEGF (en comparación con la expresión en tejido normal del mismo tipo). Los tumores pueden incluir tumores sólidos y tumores semisólidos. Los ejemplos no limitantes de tumores incluyen leucemias humanas, que incluyen leucemia linfoblástica aguda (ALL) de células que no son del tipo T (no T), leucemia mielomonocítica; y tumores sólidos y semisólidos humanos, con su vasculatura circundante que expresa endoglina en niveles de moderados a altos (en comparación con la expresión en tejido normal del mismo tipo) que incluyen angiosarcoma, carcinoma de mama, cáncer de estómago, carcinoma de colon, linfoma de Hodgkin, linfoma, glioblastoma multiforme (GBM), carcinoma de pulmón, melanoma, mieloma, linfoma, osteosarcoma, carcinoma de ovario, tumor de parótida, carcinoma faríngeo, carcinoma de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, y carcinoma rectosigmoidal.

Un tejido canceroso a tratar es, por ejemplo, un tejido endotelial que expresa un nivel anormal de endoglina y/o VEGF.

En ausencia de neovascularización del tejido tumoral, el tejido tumoral no obtiene los nutrientes requeridos, disminuye su crecimiento, cesa el crecimiento adicional, experimenta retroceso y en última instancia se vuelve necrótico lo que da lugar a la muerte del tumor. En la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir la neovascularización tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis tumoral. De manera similar, en la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento tumoral.

Los métodos son particularmente eficaces, además, contra la formación de metástasis debido a que su formación requiere la vascularización de un tumor primario de manera que las células cancerosas metastásicas puedan abandonar el tumor primario y su establecimiento en un sitio secundario requiere la neovascularización para soportar el crecimiento de las metástasis.

Se apreciará que un "sujeto que padece de un cáncer/metástasis" de la invención puede expresar una proteína mutante (antígeno asociado a tumor) o un gen mutante y aun así no ser sintomático para la enfermedad. En un ejemplo no limitante de cáncer de colon (que se asocia con la proteína K-ras mutante), un sujeto con una proteína K-ras mutante en algunas células del colon es un sujeto a tratar aun cuando ese sujeto puede no ser todavía sintomático para el cáncer de colon. Los "signos o síntomas de la enfermedad" representan las manifestaciones o indicaciones clínicamente reconocidas de la enfermedad.

Por "tratar" un sujeto que padece de tumor o metástasis, se entiende que los síntomas del sujeto se alivian parcialmente, se alivian totalmente, o se mantienen sin cambios después del tratamiento. Un paciente que se ha tratado puede exhibir un alivio parcial o total de la carga tumoral. Esto pretende incluir la profilaxis, la terapia y la cura. En un ejemplo no limitante, se trata un sujeto que padece de un cáncer altamente metastásico (por ejemplo, cáncer de mama) donde o bien no se producen metástasis adicionales, o su número se reduce en comparación con un sujeto que no recibe tratamiento. En otro ejemplo no limitante, se trata un sujeto donde o bien se reduce el tamaño del cáncer sólido del sujeto o su tamaño no aumenta en comparación con un sujeto que no recibe tratamiento. Aún en otro ejemplo no limitante, la cantidad de células cancerosas en un sujeto tratado o bien no aumenta o se reduce en comparación con la cantidad de células cancerosas en un sujeto que no recibe tratamiento. La mejoría puede definirse también, por ejemplo, como la disminución de la proliferación celular, la disminución de la cantidad de células, el aumento de la apoptosis, y/o el aumento de la supervivencia del sujeto tratado.

Como se usa, además, en la presente descripción, el tratamiento del cáncer incluye la detención, la eliminación parcial o total de un crecimiento canceroso o tumor. El tratamiento o la eliminación parcial incluyen, por ejemplo, un incremento de la reducción del crecimiento o tamaño y/o volumen tumoral tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces,

aproximadamente 50 veces, o cualquier incremento de la reducción intermedio. De manera similar, el tratamiento o la eliminación parcial pueden incluir un porcentaje de reducción del crecimiento o tamaño y/o volumen tumoral de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o cualquier porcentaje de reducción intermedio.

5

Un tumor o cáncer a tratar en los métodos descritos en la presente descripción incluye, pero no se limita a, un cáncer de pulmón, una enfermedad maligna ginecológica, un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer cerebral (por ejemplo, glioblastoma multiforme, "GBM" o un glioma) un cáncer pancreático, un cáncer de ovario, un cáncer uterino, un cáncer colorrectal, un cáncer de próstata, un cáncer de riñón, un cáncer de cabeza, un cáncer de hígado (cáncer hepatocelular), un cáncer de cuello, un cáncer de riñón (cáncer de células renales), un cáncer de pene, un cáncer de estómago, un cáncer de tiroides, un cáncer de vejiga, un sarcoma, un carcinoma, un mieloma, y linfoma. En una modalidad, un tumor a tratar es un tumor sólido o semisólido. En otra modalidad, un tumor a tratar es un tumor primario. En otra modalidad, un tumor a tratar es un tumor metastásico. En una modalidad, un tumor o cáncer a tratar es de origen epitelial. En otra modalidad, el cáncer a tratar es un mieloma. En otra modalidad, el cáncer a tratar es un cáncer de ovario. En otra modalidad, el cáncer a tratar es cáncer de riñón/renal. Aún en otra modalidad, el cáncer a tratar es cáncer hepatocelular/de hígado.

10

15

Cáncer de pulmón

20

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de pulmón. El tipo más común de cáncer de pulmón es el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que representa aproximadamente 80-85 % de los cánceres de pulmón y se divide en carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, y carcinomas de células grandes indiferenciadas. El cáncer de pulmón de células pequeñas representa 15-20 % de los cánceres de pulmón.

25

La estadificación del cáncer de pulmón es una evaluación del grado de diseminación del cáncer a partir de su fuente original. Es un factor importante que afecta el pronóstico y el tratamiento potencial del cáncer de pulmón. El carcinoma de pulmón de células no pequeñas se estadifica de IA ("uno A"; mejor pronóstico) a IV ("cuatro"; peor pronóstico). El carcinoma de pulmón de células pequeñas se clasifica como en estadio limitado si se encuentra confinado a una mitad del tórax y dentro del alcance de un solo campo de radioterapia; de cualquier otra manera, se encuentra en estadio avanzado.

30

35

El cáncer de pulmón de células no pequeñas puede estadificarse mediante el uso de EUS (ultrasonido endoscópico) o exploración por CT o MRI o en cirugía para clasificar la extensión de la enfermedad de acuerdo con el sistema TNM. Estos sujetos se someten a la estadificación como parte del proceso de consideración del pronóstico y el tratamiento. El AJCC recomienda la estadificación por TNM seguido de agrupamiento posterior.

40

45

50

Tumor primario (T): TX: El tumor primario no puede evaluarse, o hay células malignas en el esputo o el lavado broncoalveolar pero no se observan en las imágenes o la broncoscopia; Tis: Carcinoma in situ. T0: Sin evidencia de tumor primario. T1: Tumor de menos de 3 cm en su dimensión mayor, rodeado por pleura pulmonar o visceral y sin invasión en el bronquio principal observable en la broncoscopia. T2: Un tumor con cualquiera de: más de 3 cm en su dimensión mayor; que se extiende al bronquio principal (pero más de 2 cm distal a la carina), y neumonitis obstructiva (pero que no involucra a todo el pulmón). T3: Un tumor con cualquiera de: invasión de la pared torácica, diafragma, pleura mediastínica, o pericardio parietal; que se extiende al bronquio principal, dentro de 2 cm de la carina, pero no involucra la carina; y neumonitis obstructiva de todo el pulmón. T4: Un tumor con cualquiera de: invasión del mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, vértebra, o carina; nódulos tumorales independientes en el mismo lóbulo; y efusión pleural maligna. Ganglios linfáticos (N): NX: Los ganglios linfáticos no pueden evaluarse; N0: Sin ganglios linfáticos involucrados; N1: Metástasis a ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales o hiliares ipsilaterales; N2: Metástasis a ganglios linfáticos mediastínicos o subcarinales ipsilaterales; y N3: Metástasis a cualquiera de: ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales; ganglios linfáticos escalénicos ipsilaterales; y ganglios linfáticos contralaterales. Metástasis a distancia (M): MX: La metástasis a distancia no puede evaluarse; M0: Sin metástasis a distancia; y M1: La metástasis a distancia está presente.

55

Cánceres uterinos/Enfermedad maligna ginecológica

Los cánceres uterinos pueden referirse a cualquiera de los varios tipos de cáncer diferentes que se producen en el útero, específicamente: sarcomas uterinos (por ejemplo, los sarcomas del miometrio, o capa muscular del útero, son más comúnmente leiomiomas); cáncer endometrial; y cáncer cervical.

60

65

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de endometrio. El cáncer endometrial es un cáncer que comienza en el endometrio, el revestimiento interno del útero. Algunos de los ejemplos del cáncer de útero y endometrio incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinomas, adenoacantomas, carcinomas adenoescamosos, adenocarcinomas serosos papilares, adenocarcinomas de células claras, sarcomas uterinos, sarcomas estromales, tumores mesodérmicos mixtos malignos, y leiomiomas.

En otro aspecto, las composiciones son para el uso en el tratamiento del cáncer cervical, preferentemente un

adenocarcinoma en el epitelio de la cérvix. Existen dos tipos principales de este cáncer: carcinoma de células escamosas y adenocarcinomas. El primero constituye aproximadamente 80-90 % de todos los cánceres cervicales y se desarrolla donde el ectocérvix (porción más cercana a la vagina) y el endocérvix (porción más cercana al útero) se unen. El último se desarrolla en las células glandulares productoras de moco del endocérvix. Algunos cánceres cervicales tienen características de ambos y se denominan carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos.

Cáncer de ovario

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de ovario, que incluye tumores de ovario epiteliales.

El cáncer de ovario se clasifica de acuerdo con la histología del tumor, obtenida en un informe de patología. El tumor de superficie epitelial estromal, también conocido como carcinoma epitelial del ovario, es el tipo más común de cáncer de ovario. Este incluye tumor seroso, tumor endometriode y cistoadenocarcinoma mucinoso. El tumor estromal de los cordones sexuales, que incluye tumor de células de la granulosa productoras de estrógeno y tumor de células de Sertoli-Leydig virilizante o arrenoblastoma, representa el 8 % de los cánceres de ovario. El tumor de células germinales representa aproximadamente 30 % de los tumores de ovario pero solamente 5 % de los cánceres de ovario debido a que la mayoría de los tumores de células germinales son teratomas y la mayoría de los teratomas son benignos. El tumor de células germinales tiende a producirse en mujeres jóvenes y muchachas. El pronóstico depende de la histología específica del tumor de células germinales, pero en general es favorable. Los tumores mixtos contienen elementos de más de una de las clases de histología tumoral anteriores.

El cáncer de ovario también puede ser un cáncer secundario, el resultado de la metástasis de un cáncer primario en otra parte en el cuerpo. Los cánceres primarios comunes son cáncer de mama y cáncer gastrointestinal (en cuyo caso el cáncer de ovario es un cáncer de Krukenberg). El tumor de superficie epitelial estromal puede originarse en el peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal), en cuyo caso el cáncer de ovario es secundario al cáncer peritoneal primario, pero el tratamiento es básicamente el mismo que para el tumor de superficie epitelial estromal primario que involucra al peritoneo.

La estadificación del cáncer de ovario se realiza por el sistema de estadificación FIGO y usa la información obtenida después de la cirugía, la cual puede incluir histerectomía abdominal total, eliminación de ambos ovarios y trompas de Falopio, el omentum, y lavados pélvicos (peritoneales) para citología. El estadio de AJCC es igual al estadio de FIGO.

El Estadio I se refiere al cáncer de ovario limitado a uno o ambos ovarios: IA - involucra un ovario; cápsula intacta; sin tumor en la superficie del ovario; sin células malignas en la ascitis o en lavados peritoneales; IB - involucra ambos ovarios; cápsula intacta; sin tumor en la superficie del ovario; lavados negativos; y IC - tumor limitado a ovarios con cualquiera de los siguientes: ruptura de la cápsula, tumor en la superficie del ovario, lavados positivos.

El Estadio II se refiere a la extensión o implantes pélvicos: IIA - extensión o implantes en útero o trompa de Falopio; lavados negativos; IIB - extensión o implantes en otras estructuras pélvicas; lavados negativos; y IIC - extensión o implantes pélvicos con lavados peritoneales positivos

El Estadio III se refiere a implantes peritoneales microscópicos fuera de la pelvis; o limitados a la pelvis con extensión al intestino delgado o el omentum: IIIA - metástasis peritoneales microscópicas más allá de la pelvis; IIIB - metástasis peritoneales macroscópicas más allá de la pelvis de menos de 2 cm de tamaño; y IIIC - metástasis peritoneales más allá de la pelvis > 2 cm o metástasis en ganglios linfáticos

El Estadio IV se refiere a las metástasis a distancia hacia el hígado o fuera de la cavidad peritoneal.

Las metástasis en ganglios linfáticos paraaórticos se consideran ganglios linfáticos regionales (Estadio IIIC).

En algunas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción tratan un cáncer de ovario seleccionado de los siguientes: un adenocarcinoma en el ovario y un adenocarcinoma que ha migrado desde el ovario hacia la cavidad abdominal.

Melanoma

Un melanoma es un tumor maligno de melanocitos que se encuentran predominantemente en la piel pero también en el intestino y el ojo (melanoma uveal). Es uno de los tipos más raros de cáncer de piel pero causa la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer de piel. El melanoma maligno es un tipo grave de cáncer de piel causado por el crecimiento incontrolado de células pigmentarias, denominadas melanocitos. Los melanomas también incluyen, pero no se limitan a, un melanoma de coroides, melanomas malignos, melanomas cutáneos y melanomas intraoculares.

El melanoma puede dividirse en los tipos siguientes: Lentigo maligno, melanoma lentiginoso maligno, melanoma de diseminación superficial, melanoma lentiginoso acral, melanoma mucosal, melanoma nodular, melanoma polipoide,

melanoma desmoplástico, melanoma amelanótico, melanoma de tejidos blandos, y melanoma uveal. Los estadios de melanoma son los siguientes:

Estadio 0 - melanoma in situ (Nivel de Clark I).

Estadio I/II - melanoma invasivo: T1a: menos de 1,00 mm primario, sin ulceración, Nivel de Clark II-III; T1b: menos de 1,00 mm primario, con ulceración o Nivel de Clark IV-V; y T2a: 1,00-2,00 mm primario, sin ulceración.

Estadio II - Melanoma de alto riesgo: T2b: 1,00-2,00 mm primario, con ulceración; T3a: 2,00-4,00 mm primario, sin ulceración; T3b: 2,00-4,00 mm primario, con ulceración; T4a: 4,00 mm o más primario sin ulceración; y T4b: 4,00 mm o más primario con ulceración.

Estadio III - Metástasis regional: N1: un solo ganglio linfático positivo; N2: 2-3 ganglios linfáticos positivos o metástasis regional en piel/en tránsito; y N3: 4 ganglios linfáticos positivos o metástasis en ganglios linfáticos y regionales en piel/en tránsito.

Estadio IV - Metástasis a distancia: M1a: Metástasis a distancia en la piel, LDH normal; M1b: Metástasis pulmonar, LDH normal; y M1c: Otra metástasis a distancia o cualquier metástasis a distancia con LDH elevada.

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un melanoma

Cáncer de colon y cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (también denominado cáncer de colon o cáncer de intestino grueso) incluye crecimientos cancerosos en el colon, el recto (ano) y el apéndice. Con 655.000 muertes en todo el mundo al año, es la tercera forma más común de cáncer y la segunda causa principal de muerte relacionada con cáncer en el mundo occidental. Se considera que muchos cánceres colorrectales se originan a partir de pólipos adenomatosos en el colon. Estos crecimientos en forma de setas son usualmente benignos, pero algunos pueden desarrollar cáncer con el tiempo.

En otra modalidad, la clasificación de Dukes puede usarse para clasificar el cáncer colorrectal en base a los estadios A-D. El Estadio A se refiere al cáncer colorrectal limitado a la mucosa (es decir, que no ha invadido a través de la pared intestinal). El Estadio B1 se refiere a la extensión a la capa muscularis propia, pero sin penetrar a través de ella (es decir, los ganglios linfáticos no se han invadido); mientras que el cáncer en Estadio B2 ha penetrado a través de la capa muscularis propia, pero sin penetrar a través de ella (es decir, los ganglios linfáticos no se han invadido). El Estadio C1 se refiere al cáncer que se extiende en la capa muscularis propia, pero sin penetrar a través de ella (es decir, los ganglios linfáticos se encuentran involucrados); mientras que el Estadio C2 se refiere al cáncer que se extiende en la capa muscularis propia y penetra a través de ella (es decir, los ganglios linfáticos se encuentran involucrados). El Estadio D se refiere a la diseminación metastásica a distancia. El sistema TNM también puede usarse para estadificar el cáncer colorrectal de acuerdo con medios convencionales conocidos en la técnica.

Cáncer de mama

Existen varios tipos de cáncer de mama que pueden tratarse mediante los métodos descritos en la presente descripción. Un carcinoma lobular in situ y un carcinoma ductal in situ son cánceres de mama que se han desarrollado en los lóbulos y conductos, respectivamente, pero no se han diseminado al tejido adiposo que rodea la mama o a otras áreas del cuerpo. Los carcinomas lobulares y ductales infiltrantes (o invasivos) son cánceres que se han desarrollados en los lóbulos y conductos, respectivamente, y se han diseminado ya sea al tejido adiposo de la mama y/u otras partes del cuerpo. En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de mama, tal como un carcinoma ductal en el tejido de los conductos en una glándula mamaria, un cáncer de mama que es Her2- y/o ER- y/o PR-. Otros cánceres de la mama que se beneficiarían del tratamiento mediante los métodos son carcinomas medulares, carcinomas coloides, carcinomas tubulares, y cáncer de mama inflamatorio.

En una modalidad, el cáncer de mama se estadifica de acuerdo con el sistema TNM. El pronóstico se vincula estrechamente a los resultados de la estadificación, y la estadificación se usa, además, para asignar pacientes a tratamientos tanto en ensayos clínicos como en la práctica clínica.

Brevemente, la información para la estadificación es la siguiente: TX: El tumor primario no puede evaluarse. T0: Sin evidencia de tumor. Tis: Carcinoma in situ, sin invasión; T1: El tumor es de 2 cm o menos; T2: El tumor es de más de 2 cm pero no más de 5 cm; T3: El tumor es de más de 5 cm; T4: Tumor de cualquier tamaño que crece hacia la pared torácica o la piel, o cáncer de mama inflamatorio. NX: Los ganglios linfáticos cercanos no pueden evaluarse N0: el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales. N1: el cáncer se ha diseminado a 1 a 3 ganglios linfáticos maxilares o a un ganglio mamario interno N2: el cáncer se ha diseminado a 4 a 9 ganglios linfáticos maxilares o a múltiples ganglios linfáticos mamaros internos N3: Uno de los siguientes se aplica: el cáncer se ha diseminado a 10 o más ganglios linfáticos maxilares, o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos debajo de la clavícula (hueso del cuello), o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos encima de la clavícula, o el cáncer involucra los

5 ganglios linfáticos maxilares y ha agrandado los ganglios linfáticos mamaros internos, o el cáncer involucra 4 o más ganglios linfáticos maxilares, y pequeñas cantidades de cáncer se encuentran en ganglios linfáticos mamaros internos en la biopsia del ganglio linfático centinela. MX: la presencia de diseminación a distancia (metástasis) no puede evaluarse. M0: sin diseminación a distancia. M1: se ha producido diseminación a órganos distantes (que no incluyen el ganglio linfático supraclavicular).

Cáncer pancreático

10 En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer pancreático seleccionado de los siguientes: un carcinoma epiteliode en el tejido del conducto pancreático y un adenocarcinoma en un conducto pancreático. El tipo más común de cáncer pancreático es un adenocarcinoma, que se produce en el revestimiento del conducto pancreático.

Cáncer de próstata

15 En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de próstata seleccionado de los siguientes: un adenocarcinoma o un adenocarcinoma que ha migrado al hueso. El cáncer de próstata se desarrolla en el órgano prostático en los hombres, el cual rodea la primera parte de la uretra. La próstata tiene varios tipos de células pero el 99 % de los tumores son adenocarcinomas que se desarrollan en las células glandulares responsables de generar el fluido seminal.

20 Existen dos esquemas que se usan comúnmente para estadificar el cáncer de próstata. El más común es el sistema TNM, que evalúa el tamaño del tumor, la extensión de ganglios linfáticos involucrados, y cualquier metástasis (propagación a distancia). Al igual que con muchos otros cánceres, estos se agrupan frecuentemente en cuatro estadios (I-IV). Otro esquema, de uso menos común, es la estadificación de Whitmore-Jewett.

30 Brevemente, la enfermedad en Estadio I es cáncer que se encuentra por casualidad en una parte pequeña de la muestra cuando el tejido prostático se extrae por otras razones, tales como hipertrofia prostática benigna, y las células parecen células casi normales y la glándula se siente normal con el dedo de examinador. En el Estadio II una parte mayor de la próstata se encuentra involucrada y puede sentirse un bulto dentro de la glándula. En el Estadio III, el tumor se ha diseminado a través de la cápsula prostática y el bulto puede sentirse en la superficie de la glándula. En la enfermedad en Estadio IV, el tumor ha invadido las estructuras cercanas, o se ha diseminado a los ganglios linfáticos u otros órganos. La clasificación se basa en el contenido celular y la arquitectura tisular de las biopsias (Gleason) lo que proporciona un estimado del potencial destructivo y el pronóstico final de la enfermedad.

Cánceres de cabeza y cuello

40 Los cánceres de cabeza y cuello (por ejemplo, oral, laríngeo, nasofaríngeo, esofágico, etc.), se refieren a un grupo de cánceres biológicamente similares que se originan a partir del tracto aerodigestivo superior, que incluyen el labio, la cavidad oral (boca), la cavidad nasal, los senos paranasales, la faringe, y la laringe. La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello son carcinomas de células escamosas, que se originan a partir del revestimiento mucosal (epitelio) de estas regiones. Frecuentemente, los cánceres de cabeza y cuello se diseminan a los ganglios linfáticos del cuello, y esta es frecuentemente la primera (y algunas veces la única) manifestación de la enfermedad en el momento del diagnóstico. El cáncer de cabeza y cuello se asocia fuertemente con ciertos factores de riesgo ambientales y del estilo de vida, que incluyen el consumo de tabaco, el consumo de alcohol, y ciertas cepas de los papilomavirus humanos de transmisión sexual. El manejo de pacientes con cánceres de cabeza y cuello continúa siendo una tarea formidable. Los cánceres tales como, cáncer hipofaríngeo, cáncer laríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer orofaríngeo, pueden tratarse mediante el uso de los compuestos descritos en la presente descripción.

50 En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un cáncer de cabeza o cuello.

Cáncer de riñón

55 En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de riñón. El cáncer de riñón (también denominado cáncer de células renales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma renal, e hipernefoma) es una enfermedad en la que se encuentran células malignas en el revestimiento de los túbulos en el riñón. El carcinoma de células renales es la forma más común de cáncer de riñón que se origina a partir del túbulo renal proximal. Es el tipo más común de cáncer de riñón en los adultos, responsable de aproximadamente 80 % de los casos.

Cáncer de hígado

65 En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones para el uso en el tratamiento del cáncer de hígado primario (cáncer que comienza en el hígado). El cáncer de hígado primario puede producirse tanto en adultos como en niños. El cáncer de hígado se caracteriza por la presencia de tumores hepáticos malignos - tumores o

crecimientos sobre o en el hígado. Pueden descubrirse en imágenes médicas (incluso por una razón diferente al cáncer en sí), o pueden estar presentes en pacientes como una masa abdominal, dolor abdominal, ictericia, o alguna otra disfunción hepática. Existen varios tipos de cáncer de hígado.

5 Hemangiomas: Estos constituyen el tipo más común de tumor hepático benigno. Comienzan en los vasos sanguíneos. La mayoría de estos tumores no causan síntomas, no necesitan tratamiento. Algunos pueden presentar hemorragia y es necesario extraerlos si son de leves a graves.

10 Adenomas hepáticos: Estos tumores hepáticos epiteliales benignos se desarrollan en el hígado. En la mayoría de los casos, se ubican en el lóbulo hepático derecho y se observan frecuentemente solos. El tamaño de los adenomas varía de 1 a 30 cm. Todos los síntomas asociados con los adenomas hepáticos se asocian con grandes lesiones que pueden causar dolor abdominal intenso.

15 Hiperplasia nodular focal: La hiperplasia nodular focal (FNH) es el segundo tumor más común del hígado. Este tumor es el resultado de una respuesta de los hepatocitos a la malformación arteriovenosa congénita. Este proceso es uno en el cual todos los constituyentes normales del hígado están presentes, pero el patrón mediante el cual se presentan es anormal. Aun cuando existen esas condiciones el hígado todavía parece funcionar en el intervalo normal.

20 Cáncer hepatocelular: El cáncer hepatocelular (HCC) es el cáncer más común del hígado. Se asocia con el abuso de alcohol y la infección por hepatitis B y es particularmente prevalente en Asia. La mayoría de los HCC se detectan en un momento cuando la cura por resección quirúrgica no es posible; el tratamiento sistémico del HCC no extirpable se asocia con una supervivencia de menos de un año.

25 En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un cáncer de hígado.

Linfoma

30 El linfoma es un tipo de cáncer que se origina en linfocitos del sistema inmunológico. Frecuentemente se originan en ganglios linfáticos, y se presentan como un agrandamiento del ganglio (un tumor). Los linfomas se relacionan estrechamente con las leucemias linfoides, que también se originan en linfocitos pero típicamente solo involucran la sangre circulante y la médula ósea (donde se generan las células de la sangre en un proceso denominado hematopoyesis) y usualmente no forman tumores. Existen muchos tipos de linfomas, y a su vez, los linfomas son una parte del amplio grupo de enfermedades denominadas neoplasmas hematológicos. Algunas formas de linfoma son indolentes (por ejemplo, el linfoma linfocítico pequeño), compatibles con una vida prolongada incluso sin tratamiento, mientras que otras formas son agresivas (por ejemplo, el linfoma de Burkitt), y causan deterioro rápido y muerte.

40 La clasificación de la WHO, publicada en 2001 y actualizada en 2008; <http://en.wikipedia.org/wiki/linfoma> - cite_note-isbn92-832-2411-6-2#cite_note-isbn92-832-2411-6-2 es la clasificación más reciente de linfoma y se basa en los fundamentos expuestos dentro de la "Revised European-American Lymphoma classification" (REAL). Este sistema agrupa los linfomas según el tipo de célula (es decir, el tipo de célula normal que se asemeja mejor al tumor) y las características fenotípicas, moleculares o citogenéticas que los definen. Existen tres grandes grupos: los tumores de células B, de células T, y de células asesinas naturales. Se reconocen, además, otros grupos menos comunes. El linfoma de Hodgkin, aunque se considera de manera independiente dentro de las clasificaciones de la WHO (y las precedentes), ahora se reconoce como un tumor de, aunque notablemente anormal, linfocitos del linaje de células B maduras.

45 En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un linfoma.

50 Sarcoma

Un sarcoma es un cáncer del tejido conectivo (hueso, cartílago, grasa) que da lugar a la proliferación del mesodermo.

55 Este se contrapone a los carcinomas, que son de origen epitelial (mama, colon, páncreas, y otros). Sin embargo, debido a una comprensión creciente del origen tisular, el término "sarcoma" se aplica algunas veces a los tumores cuyo origen ahora conocido es el tejido epitelial. El término sarcoma de tejidos blandos se usa para describir tumores de tejidos blandos, que incluyen elementos que se encuentran en tejido conectivo, pero no se derivan de este (tal como músculos y vasos sanguíneos).

60 Los sarcomas reciben una serie de nombres diferentes, en base al tipo de tejido a partir del cual se originan. Por ejemplo, el osteosarcoma se origina a partir de hueso, el condrosarcoma se origina a partir de cartílago, y el leiomiomasarcoma se origina a partir de músculo liso. Los sarcomas afectan a las personas en todos los intervalos de edades, pero son muy raros, pues representan solamente 1 % de todos los casos de cáncer. El GIST es la forma más común de sarcoma, con aproximadamente 3000-3500 casos al año en los Estados Unidos. Esto debe compararse con el cáncer de mama, con aproximadamente 200.000 casos al año en Norteamérica.

5 Aproximadamente 50 % de los sarcomas óseos y 20 % de los sarcomas de tejidos blandos se diagnostican en personas menores de 35 años. Algunos sarcomas, tales como leiomioma, condrosarcoma, y tumor estromal gastrointestinal (GIST), son más comunes en adultos que en niños. Los sarcomas óseos de mayor grado, que incluyen el sarcoma de Ewing y osteosarcoma, son mucho más comunes en niños y adultos jóvenes.

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un sarcoma.

10 Carcinoma

Un carcinoma es cualquier cáncer maligno que se origina a partir de células epiteliales. Los carcinomas invaden los tejidos y órganos circundantes y pueden hacer metástasis, o diseminarse, a ganglios linfáticos y otros sitios.

15 El carcinoma, como todas las neoplasias, se clasifica según su apariencia histológica. Adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas, dos términos descriptivos comunes para tumores, reflejan el hecho de que estas células pueden tener apariencias de células glandulares o escamosas respectivamente. Los tumores gravemente anaplásicos podrían ser tan indiferenciados que no tienen una apariencia histológica definida (carcinoma indiferenciado).

20 Algunas veces un tumor se refiere según el presunto órgano del primario (por ejemplo, carcinoma de la próstata) o la supuesta célula de origen (carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales).

25 El adenocarcinoma es un tumor maligno que se origina en las células epiteliales del tejido glandular y forma estructuras glandulares. Este es común en pulmón (donde forma 30-40 % de todos los carcinomas de pulmón). Se encuentra periféricamente, con origen en células caliciformes o neumocitos de tipo II.

El carcinoma de células escamosas es el resultado de la metaplasia escamosa. Este representa 20-30 por ciento de los tumores de pulmón y usualmente es de origen hilar.

30 El carcinoma de células pequeñas se debe casi con certeza al consumo de tabaco. Hace metástasis temprano, y puede secretar ADH (lo que reduce la concentración de sodio del paciente).

Los carcinomas de células grandes indiferenciadas representan 10-15 por ciento de los neoplasmas de pulmón. Son agresivos y difíciles de reconocer debido a la naturaleza indiferenciada. Son más comúnmente centrales en el pulmón.

35 Carcinoma indiferenciado nasosinusal.

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un carcinoma.

40 Mieloma

45 El mieloma múltiple (también conocido como MM, mieloma, mieloma de células plasmáticas, o como enfermedad de Kahler por Otto Kahler) es un cáncer de células plasmáticas. Estas células inmunológicas se forman en la médula ósea, son numerosas en la linfa y producen anticuerpos. El mieloma se considera incurable, pero las remisiones pueden inducirse con esteroides, quimioterapia, talidomida y trasplantes de células madre. El mieloma es parte del amplio grupo de enfermedades denominadas enfermedades hematológicas malignas.

50 El mieloma múltiple se desarrolla en linfocitos B posteriores al centro germinal. Una translocación cromosómica entre el gen de cadena pesada de inmunoglobulina (en el cromosoma catorce, locus 14q32) y un oncogén (frecuentemente 11q13, 4p16.3, 6p21, 16q23 y 20q11) se observa frecuentemente en pacientes con mieloma múltiple. Esta mutación da lugar a la pérdida de la regulación del oncogén lo cual se considera que es un evento de iniciación importante en la patogénesis del mieloma. El resultado es la proliferación de un clon de células plasmáticas e inestabilidad genómica que conduce a mutaciones y translocaciones adicionales. La anomalía en el cromosoma 14 se observa en aproximadamente 50 % de todos los casos de mieloma. La eliminación de (partes de) el cromosoma trece también se observa en aproximadamente 50 % de los casos.

60 La producción de citocinas (especialmente IL-6) por las células plasmáticas causa mucho de su daño localizado, tal como osteoporosis, y crea un microambiente en el cual las células malignas prosperan. La angiogénesis (la atracción de nuevos vasos sanguíneos) aumenta.

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un mieloma.

65 Cáncer de estómago

El cáncer de estómago o gástrico puede desarrollarse en cualquier parte del estómago y puede diseminarse en todo el estómago y a otros órganos; particularmente el esófago, los pulmones y el hígado. El cáncer de estómago causa aproximadamente 800.000 muertes al año en todo el mundo.

5

Se produce metástasis en 80-90 % de los individuos con cáncer de estómago, con una tasa de supervivencia a los seis meses de 65 % en aquellos diagnosticados en estadios tempranos y menos de 15 % de aquellos diagnosticados en estadios tardíos.

10

El cáncer de estómago es frecuentemente asintomático o causa solamente síntomas no específicos en sus estadios tempranos. En el momento en que aparecen los síntomas, el cáncer generalmente ha hecho metástasis a otras partes del cuerpo, una de las principales razones de su mal pronóstico.

15

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un cáncer de estómago.

Cáncer de tiroides

20

El neoplasma de tiroides o cáncer de tiroides usualmente se refiere a cualquiera de los cuatro tipos de tumores malignos de la glándula tiroides: papilar, folicular, medular o anaplásico. Los tumores papilares y foliculares son los más comunes. Crecen lentamente y pueden recurrir, pero generalmente no son fatales en pacientes menores de 45 años de edad. Los tumores medulares tienen un buen pronóstico si se restringen a la glándula tiroides y un pronóstico más malo si se produce metástasis. Los tumores anaplásicos son de crecimiento rápido y responden mal a la terapia.

25

El cáncer de tiroides se encuentra usualmente en un paciente eutiroideo, pero los síntomas de hipertiroidismo o hipotiroidismo pueden asociarse con un tumor bien diferenciado grande o metastásico. Los nódulos son de particular interés cuando se encuentran en aquellos menores de 20 años de edad. La presentación de nódulos benignos en esta edad es menos probable, y por lo tanto el potencial de malignidad es mucho mayor.

30

Los cánceres de tiroides pueden clasificarse de acuerdo con sus características patológicas. Las variantes siguientes pueden distinguirse (la distribución en varios subtipos puede mostrar variación regional): cáncer de tiroides papilar (hasta 75 %); cáncer de tiroides folicular (hasta 15 %); cáncer de tiroides medular (hasta 8 %); y cáncer de tiroides anaplásicos (menos de 5 %). Los tipos folicular y papilar en conjunto pueden clasificarse como "cáncer de tiroides diferenciado". Estos tipos tienen un pronóstico más favorable que los tipos medular e indiferenciado. El adenoma de tiroides es un neoplasma benigno de la tiroides.

35

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un cáncer de tiroides.

Cáncer de vejiga

40

Cáncer de vejiga se refiere a cualquiera de los varios tipos de crecimientos malignos de la vejiga urinaria. Es una enfermedad en la cual las células anormales se multiplican sin control en la vejiga. La vejiga es un órgano hueco, muscular que almacena orina; se ubica en la pelvis. El tipo más común de cáncer de vejiga comienza en células que revisten el interior de la vejiga y se denomina carcinoma de células transicionales (algunas veces carcinoma de células uroteliales).

45

El 90 % de los cánceres de vejiga son carcinomas de células transicionales. El otro 10 % son carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células pequeñas y depósitos secundarios de cánceres en otra parte en el cuerpo.

50

Los estadios siguientes se usan para clasificar la ubicación, el tamaño, y la diseminación del cáncer, de acuerdo con el sistema de estadificación TNM (tumor, ganglio linfático, y metástasis): Estadio 0: Las células cancerosas se encuentran solamente en el revestimiento interno de la vejiga. Estadio I: Las células cancerosas han proliferado a la capa debajo del revestimiento interno de la vejiga urinaria pero no a los músculos de la vejiga urinaria. Estadio II: Las células cancerosas han proliferado a los músculos en la pared de la vejiga pero no al tejido adiposo que rodea la vejiga urinaria. Estadio III: Las células cancerosas han proliferado al tejido adiposo que rodea la vejiga urinaria y a la glándula prostática, la vagina, o el útero, pero no a los ganglios linfáticos u otros órganos. Estadio IV: Las células cancerosas han proliferado a los ganglios linfáticos, la pared pélvica o abdominal, y/u otros órganos. Recurrente: El cáncer ha reaparecido en la vejiga urinaria o en otro órgano cercano después de haberse tratado.

60

El TCC de vejiga se estadifica de acuerdo con el sistema TNM de 1997: Ta Tumor papilar no invasivo; T1 Invasivo pero no tan lejos como la capa muscular de la vejiga; T2 Invasivo a la capa muscular; T3 Invasivo más allá del músculo a la grasa fuera de la vejiga; y T4 Invasivo a las estructuras circundantes como la próstata, el útero o la pared pélvica.

65

En una modalidad, las composiciones descritas en la presente descripción son para el uso en el tratamiento de un cáncer de vejiga.

Afecciones oculares que involucran a la angiogénesis

Afecciones de degeneración macular y retinopatía diabética

5

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones para el uso en el tratamiento de la retinopatía diabética, la degeneración macular, la neovascularización coroidal o el glaucoma neovascular en un paciente.

10

La degeneración macular (AMD) es la pérdida de fotorreceptores en la porción de la retina central, denominada la mácula, responsable de la visión de agudeza alta. La degeneración de la mácula se asocia con la deposición anormal de componentes de la matriz extracelular y otros restos en la membrana entre el epitelio pigmentario retinal y la coroides vascular. Este material similar a restos se denomina drusas. Las drusas se observan con un examen fundoscópico del ojo. Los ojos normales pueden tener máculas libres de drusas, pero las drusas pueden ser abundantes en la periferia retinal. La presencia de drusas blandas en la mácula, en ausencia de cualquier pérdida de visión macular, se considera un estadio temprano de AMD. La degeneración macular se caracteriza por neovascularización coroidal (CNV), el desarrollo de vasos sanguíneos anormales debajo de la capa del epitelio pigmentario retinal (RPE) de la retina. Estos vasos atraviesan la membrana de Bruch, lo que rompe el epitelio pigmentario retinal, produce hemorragia, y eventualmente causa la cicatrización macular lo que da lugar a una pérdida profunda de la visión central (cicatrización disciforme).

20

La neovascularización coroidal (CNV) se produce comúnmente en la degeneración macular además de otros trastornos oculares y se asocia con la proliferación de células endoteliales coroidales, la sobreproducción de matriz extracelular, y la formación de una membrana subretinal fibrovascular. La proliferación celular en el epitelio pigmentario retinal y la producción de factores angiogénicos parecen efectuar la neovascularización coroidal.

25

La retinopatía diabética (DR) es un trastorno ocular caracterizado por angiogénesis excesiva que se desarrolla en la diabetes debido al engrosamiento de las membranas basales de los capilares, y la carencia de contacto entre los pericitos y las células endoteliales de los capilares. La pérdida de pericitos aumenta la fuga de los capilares y conduce a la ruptura de la barrera hematorretiniana. La retinopatía diabética es el resultado de cambios retinales microvasculares.

30

La muerte de pericitos inducida por hiperglucemia y el engrosamiento de la membrana basal conducen a la incompetencia de las paredes vasculares. Estos daños cambian la formación de la barrera hematorretiniana y provocan, además, que los vasos sanguíneos retinales se vuelvan más permeables. Los vasos sanguíneos pequeños - tales como los del ojo - son especialmente vulnerables al control deficiente del azúcar en sangre (glucosa sanguínea). Una sobreacumulación de glucosa y/o fructosa daña los vasos sanguíneos pequeños en la retina. Puede desarrollarse, además, edema macular cuando se produce la fuga de fluido y lípidos desde los vasos sanguíneos dañados hacia la mácula. Estos fluidos hacen que la mácula se hinche, lo que produce visión borrosa. Este daño da lugar, además, a una carencia de oxígeno en la retina.

35

A medida que la enfermedad progresa, la carencia de oxígeno en la retina estimula la angiogénesis en la retina y en el humor vítreo transparente, similar a un gel, que llena el interior del ojo. Sin tratamiento oportuno, estos nuevos vasos sanguíneos pueden presentar hemorragia, nublar la visión, y destruir la retina. La proliferación fibrovascular puede causar, además, desprendimiento de retina por tracción. Los nuevos vasos sanguíneos pueden crecer, además, en el ángulo de la cámara anterior del ojo y causar glaucoma neovascular.

40

45

La vitreorretinopatía proliferativa se asocia con la proliferación celular de membranas celulares y fibróticas dentro de las membranas vítreas y en las superficies de la retina. La proliferación y migración de células del epitelio pigmentario retinal es común con este trastorno ocular. Las membranas asociadas con la vitreorretinopatía proliferativa contienen componentes de matriz extracelular tales como colágeno de los tipos I, II, y IV y fibronectina, y se vuelven progresivamente fibróticas.

50

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y la retinopatía diabética son las dos causas principales de ceguera en el primer mundo. La aprobación reciente de las macromoléculas LUCENTIS®, AVASTIN®, y MACUGEN® ha mejorado las opciones de tratamiento disponibles para los pacientes con AMD. LUCENTIS® es un Fab y AVASTIN® es un anticuerpo monoclonal. Ambos se unen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y han demostrado los resultados más impresionantes hasta la fecha en el tratamiento de la AMD; sin embargo, solo una minoría de los pacientes tratados experimenta una mejoría significativa de la agudeza visual. La terapia antiangiogénica enfocada en un objetivo distinto al VEGF puede superar algunas de las limitaciones asociadas con los agentes dirigidos a la vía de VEGF.

55

60

Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar o prevenir la degeneración macular, la CNV, la retinopatía diabética, o la vitreorretinopatía proliferativa. En la presente descripción se describen composiciones para el uso en el tratamiento o prevención de la degeneración macular, la CNV, la retinopatía diabética, o la vitreorretinopatía proliferativa. Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción también pueden contraer los vasos sanguíneos, inhibir la proliferación de células endoteliales asociada con enfermedad ocular, eliminar los síntomas de hemorragia, tratar la visión nublada, proporcionar la detención de la pérdida de visión, y/o prevenir las fugas de los vasos sanguíneos. Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la

65

presente descripción pueden usarse, además, en medicamentos para el tratamiento de la degeneración macular, la CNV, la retinopatía diabética o la vitreorretinopatía proliferativa.

5 Además, los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción también pueden usarse en combinación con terapias y/o compuestos conocidos para el tratamiento de la degeneración macular, la CNV, la retinopatía diabética o la vitreorretinopatía proliferativa. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, bevacizumab (AVASTIN®), ranibizumab (LUCENTIS®), VEGF-Trap, sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib, pazopanib o MACUGEN®. Además de los modos de administración descritos en la presente descripción, los anticuerpos antiendoglina quiméricos pueden administrarse por medio de vías intravítreas. Los ejemplos
10 no limitantes de modos de administración intravítreos incluyen inyección intravítrea y el uso de implantes intravítreos. Los pacientes pueden evaluarse para determinar su mejoría y sensibilidad al tratamiento. El tratamiento incluye, pero no se limita a, disminuir el edema macular, disminuir las áreas de CNV, y aumentar la agudeza visual. Las mediciones de los síntomas se realizan como se conoce en la técnica y se describen, además, en los ejemplos más abajo.

15 Enfermedades inflamatorias crónicas

Cualquiera de una variedad de tejidos u órganos que comprenden tejidos organizados, puede soportar la angiogénesis en condiciones de enfermedad los que incluyen piel, músculo, intestino, tejido conectivo, articulaciones, huesos y tejido similar en el que los vasos sanguíneos pueden invadir tras los estímulos angiogénicos. Por lo tanto, un tejido a tratar
20 puede ser un tejido inflamado y la angiogénesis a inhibir puede ser la angiogénesis del tejido inflamado donde existe neovascularización del tejido inflamado.

Enfermedad inflamatoria intestinal

25 La angiogénesis desempeña una función importante en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). La IBD es un término que agrupa un conjunto de enfermedades o afecciones intestinales que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn se caracteriza típicamente por inflamación del intestino delgado y grueso, mientras que la colitis ulcerosa se localiza generalmente en el colon. La angiogénesis anormal o patológica es central tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa. Ambas enfermedades involucran el aumento de la densidad
30 microvascular y la disfunción microvascular, y esta angiogénesis se relaciona temporalmente con la patología del tejido y los ciclos de inflamación que se encuentran en ambas enfermedades. Se conoce que la endoglina se expresa en estos tejidos y desempeña una función en la pérdida de la regulación de la angiogénesis durante la IBD. (Chidlow y otros, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 293:5-18 (2007)).

35 Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar IBD. Además, los anticuerpos antiendoglina quiméricos pueden usarse para el tratamiento de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. Los anticuerpos antiendoglina quiméricos pueden usarse, además, en combinación con cirugía y/o terapias conocidas para IBD, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Los ejemplos de tales terapias conocidas incluyen, pero no se limitan a, aminosalicilatos (por ejemplo, mesalamina), corticosteroides (por ejemplo, budesonida, prednisona, etc.),
40 antibióticos (por ejemplo, metronidazol, etc.), fármacos inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, tacrolimus, y ciclosporina, etc.), y fármacos biológicos tales como proteínas y anticuerpos (por ejemplo, infliximab, etc.).

45 El tratamiento de IBD puede evaluarse por la disminución de la vascularización del tejido inflamado. El tratamiento puede evaluarse, además, por la detención, resolución, y/o cicatrización de las lesiones ulcerosas que caracterizan la IBD.

Nefropatía diabética & Isquemia por trasplante renal

50 La nefropatía diabética es una causa principal de morbilidad y mortalidad en diabéticos tanto de tipo 1 como de tipo 2. Es la causa principal de enfermedad renal en estadio terminal en todo el mundo. La nefropatía diabética se caracteriza por lesión microvascular glomerular debido al aumento de la síntesis de factores proangiogénicos. Estos factores proangiogénicos causan aumento de la proliferación de células endoteliales y posterior angiogénesis, y se conoce que la endoglina se regula positivamente en la enfermedad renal crónica. Esta angiogénesis da lugar a la destrucción de los
55 glomérulos y por último al fallo renal.

Efectos similares se observan en el trasplante renal lo que da lugar a isquemia y fallo del órgano trasplantado. La regulación positiva de la endoglina da lugar a la regulación positiva de la angiogénesis y la inflamación en el riñón. Por el contrario, los estudios con ratones nulos para endoglina muestran una reducción significativa del daño renal después del trasplante/isquemia y aumento de la supervivencia del órgano.
60

Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar o prevenir la nefropatía diabética, el fallo renal después del trasplante, y/o la lesión renal isquémica después del trasplante.

65 En la presente descripción se describen métodos para tratar o prevenir la nefropatía diabética, el fallo renal después del trasplante, y/o la lesión renal isquémica después del trasplante por medio de la administración de los anticuerpos

- 5 descritos en la presente descripción. Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, en medicamentos para el tratamiento de la nefropatía diabética, el fallo renal después del trasplante, y/o la lesión renal isquémica después del trasplante. Además, los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción también pueden usarse en combinación con terapias y/o compuestos conocidos para el tratamiento de la nefropatía diabética, el fallo renal después del trasplante, y/o la lesión renal isquémica después del trasplante.
- 10 Los pacientes pueden evaluarse con respecto a la eficacia del tratamiento mediante, por ejemplo, la mejoría de la función renal.
- Artritis reumatoide & Osteoartritis
- 15 La artritis reumatoide se caracteriza por angiogénesis excesiva, y se entiende bien en este sentido. La inflamación y destrucción encontradas en los fluidos sinoviales se relacionan directamente con el aumento de la angiogénesis que se encuentra en los alrededores y en los tejidos sinoviales. Numerosos factores proangiogénicos están presentes en los tejidos afectados de pacientes con artritis reumatoide.
- 20 La osteoartritis es un grupo de afecciones crónicas inhabilitantes que afectan las articulaciones sinoviales. La angiogénesis y la inflamación son procesos integrales en la fisiopatología de la enfermedad, y contribuyen al daño a las articulaciones a través de una variedad de mecanismos, que incluyen pero no se limitan a, estimulación de la producción de MMP y osificación endocondral. Además, la angiogénesis en la osteoartritis induce la inervación adicional, lo que desarrolla un bucle de retroalimentación donde cada una continúa la estimulación de la otra.
- 25 Los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar o prevenir la artritis reumatoide y la osteoartritis. En la presente descripción se describen métodos para tratar o prevenir la artritis reumatoide y la osteoartritis por medio de la administración de una o más de las composiciones descritas en la presente descripción. Los anticuerpos antiendoglina quiméricos humanizados descritos en la presente descripción pueden usarse, además, en medicamentos para el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis.
- 30 Dos medidas combinadas de amplia aceptación de la mejoría de la RA en los ensayos son: los criterios de Paulus y los criterios del Colegio estadounidense de reumatología (ACR). Los criterios de Paulus se definen como la mejoría en 4 de los siguientes: recuento de las articulaciones sensibles e hinchadas, rigidez matutina, evaluación por el paciente de la actividad de la enfermedad, evaluación por el médico de la actividad de la enfermedad y el intervalo de velocidad de eritrosedimentación (ESR). El nivel de mejoría se establece como un porcentaje de mejoría de cada una de estas variables es decir una clasificación de Paulus de 20 indica un sujeto que responde al tratamiento que ha demostrado 20 % de mejoría en 4 de los 6 parámetros.
- 35 La artritis reumatoide puede evaluarse, además, mediante el uso de la puntuación del Colegio estadounidense de reumatología (ACR). Brevemente, los criterios de clasificación de ACR para la determinación de la remisión clínica en la artritis reumatoide se evalúan por la presencia de 5 o más de los factores siguientes presentes al menos dos meses consecutivos:
- 40 a. Rigidez matutina < 15 minutos;
b. Sin fatiga;
45 c. Sin dolor en las articulaciones;
d. Sin sensibilidad de las articulaciones o dolor al movimiento;
e. Sin hinchazón de tejidos blandos en las articulaciones o vainas tendinosas; y
f. ESR (método de Westergren) < 30 mm/hora para una hembra o 20 mm/hora para un varón.
- 50 Pueden producirse exclusiones e incluyen: las manifestaciones clínicas de vasculitis activa, pericarditis, pleuritis o miositis, y la pérdida de peso reciente inexplicable o fiebre atribuible a la artritis reumatoide prohibirán una designación de remisión clínica completa (Pinals RS, et.al.: Arthritis Rheum 24:1308, 1981). Además, los criterios de clasificación de ACR del estado funcional en la artritis reumatoide incluyen la clasificación en base a las siguientes capacidades del paciente:
- 55 Clase I: Completamente capaz de realizar actividades usuales de la vida diaria (autocuidado, profesionales, y aprofesionales);
- 60 Clase II: Capaz de realizar actividades de autocuidado y profesionales usuales, pero limitado en las actividades aprofesionales;
- Clase III: Capaz de realizar actividades de autocuidado usuales, pero limitado en las actividades profesionales y aprofesionales; y
- 65 Clase IV: Capacidad limitada de realizar actividades de autocuidado, profesionales, y aprofesionales usuales.

La osteoartritis puede evaluarse, además, mediante el uso de la puntuación de ACR. Los criterios de clasificación clínica de ACR para la osteoartritis de la cadera se evalúan mediante la utilización de la historia del paciente, el examen físico y los resultados de laboratorio: un paciente se evalúa para el dolor en la cadera y uno de los siguientes:

(1) Rotación interna de la cadera de menos de 15 grados y ESR menor que o igual a 45 grados mm/hora o flexión de la cadera menor que o igual a 115 grados si no se dispone de ESR; o

(2) Rotación interna de la cadera de menos de 15 grados, dolor asociado con la cadera interna, rigidez matutina de la cadera menor que o igual a 60 minutos y el paciente tiene más de 50 años de edad.

Mediante el uso de la historia, el examen físico, los resultados de laboratorio y radiográficos, el formato tradicional es dolor en la cadera y dos de las indicaciones siguientes: ESR menor que 20 mm/hora, osteofitos femorales y/o acetabulares visibles por radiografía, o estrechamiento del espacio articular visible por radiografía (superior, axial, y/o medial). Un árbol de clasificación es el siguiente: dolor en la cadera en asociación con (1) osteofitos femorales y/o acetabulares visibles por radiografía o (2) ESR menor que o igual a 20 mm/hora y estrechamiento del espacio articular axial visible por radiografía (Altman, R, y otros.: *Arthritis Rheum* 34:505, 1991).

Criterios de clasificación clínica de ACR para la osteoartritis de la rodilla

Los criterios de clasificación clínica de ACR para la osteoartritis de la rodilla se evalúan mediante el uso de la historia y el examen físico que utiliza los criterios siguientes: dolor en la rodilla junto con tres (3) de los siguientes:

- (1) un paciente de más de 50 años de edad;
- (2) menos de 30 minutos de rigidez matutina;
- (3) crepitación en movimiento activo;
- (4) sensibilidad ósea;
- (5) agrandamiento óseo; y
- (6) sin calor palpable del fluido sinovial.

Mediante el uso de la historia del paciente, el examen físico y los resultados radiográficos, el dolor en la rodilla puede evaluarse junto con una de las siguientes características del paciente: (1) un paciente de más de 50 años de edad; (2) menos de 30 minutos de rigidez matutina; y (3) crepitación en movimiento activo y osteofitos. Mediante el uso de la historia, el examen físico y los resultados de laboratorio: el dolor en la rodilla puede evaluarse junto con cinco (5) de las características siguientes:

- (1) un paciente de más de 50 años de edad;
- (2) menos de 30 minutos de rigidez matutina;
- (3) crepitación en movimiento activo;
- (4) sensibilidad ósea;
- (5) agrandamiento óseo;
- (6) sin calor palpable del fluido sinovial;
- (7) ESF menor que 40 mm/hora;
- (8) factor reumatoide (RF) de menos de 1:40; y
- (9) signos de osteoartritis en el fluido sinovial (SF).

Ver, por ejemplo, Altman, R, y otros.: *Arthritis Rheum* 29:1039, 1986.

Los criterios de clasificación clínica de ACR para la osteoartritis de la mano pueden evaluarse de la siguiente manera: dolor, malestar o rigidez en la mano junto con tres (3) de los siguientes: (1) agrandamiento de tejidos duros de dos o más de las articulaciones siguientes (las articulaciones interfalangeales distales segunda y tercera, interfalangeales proximales segunda y tercera, y la primera carpometacarpal de ambas manos; (2) agrandamiento de tejidos duros de dos o más articulaciones interfalangeales distales; (3) menos de tres articulaciones MCP hinchadas y (4) deformidad de al menos una de las articulaciones relacionadas anteriormente en (1).

Terapia de combinación

De acuerdo con las modalidades descritas en la presente descripción, las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse solas o en combinación con uno o más agentes activos o inactivos adicionales. Cuando se usan combinaciones, puede usarse la administración simultánea o secuencial de los anticuerpos antiendoglina quiméricos y los anticuerpos anti-VEGF (fragmentos de unión al antígeno de estos).

Los compuestos pueden administrarse, según sea necesario, en combinación con uno o más tratamientos terapéuticos adicionales que incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, ciclofosfamida, paclitaxel, pemetrexed, temozolomida, oxaliplatino, erbitux, vectibix, sorafenib, sunitinib, gefitinib, erlotinib, 5-fluorouracilo (5-FU) irinotecán, topotecán, leucovorina, VELCADE®, lenalidomida, talidomida, xeloda, taxotere y muchas otras terapias contra el cáncer

convencionales descritas en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, "radiación" se refiere a, por ejemplo, microondas, ultravioleta (UV), infrarrojo (IR), o radiación alfa, beta o gamma. La radiación puede suministrarse "focalmente" o localmente mediante el uso de técnicas convencionales para dirigir la radiación al sitio de uno o más tumores sin irradiar todo el cuerpo. Se entenderá que la lista de regímenes terapéuticos que se relaciona más abajo representa las terapias convencionales, pero la presente invención incluye otros regímenes terapéuticos conocidos que no se describen específicamente en la presente descripción.

En una modalidad, el cáncer es cáncer de ovario y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, quimioterapia (por ejemplo, doxorubicina, doxil, gemcitabina, rubitecán, y agentes quimioterapéuticos a base de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), melfalán, inhibidores de topoisomerasa I tales como topotecán e irinotecán, terapia a base de taxano, hormonas, terapia de radiación, hipotermia de cuerpo completo, derivados de isoflavona tales como fenoxodiol, macrólidos citotóxicos tales como epotilonas, inhibidores de la angiogénesis tales como bevacizumab, inhibidores de la transducción de señales tales como trastuzumab, terapia génica, terapia de iARN, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, inhibidores de quinasa similares a fosfatidilinositol tales como rapamicina, o cualquier combinación de estos. La terapia de combinación de los anticuerpos descritos en la presente descripción con las terapias contra el cáncer de ovario puede proporcionar, además, dosis más bajas de cualquiera de las terapias, o ambas, debido a un efecto sinérgico de la administración conjunta de las terapias.

En una modalidad, el cáncer es cáncer renal/de riñón y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, quimioterapia, pazopanib, interferón alfa o IL-2. Aún en otra modalidad, el agente adicional es un inhibidor del receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen los descritos anteriormente, ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib. La terapia de combinación de los anticuerpos descritos en la presente descripción con las terapias contra el cáncer de riñón pueden proporcionar, además, dosis más bajas de cualquiera de las terapias, o ambas, debido a un efecto sinérgico de la administración conjunta de las terapias.

En una modalidad, el cáncer es un mieloma y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, radioterapia, VELCADE®, lenalidomida, o talidomida. En una modalidad el agente adicional es VELCADE®. Las dosis de cualquiera de estas terapias se conocen en la técnica y pueden ajustarse en consecuencia con la terapia de combinación.

En una modalidad, el cáncer es cáncer de próstata y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, radioterapia (por ejemplo, haz externo o braquiterapia), privación hormonal (supresión de andrógenos con inclusión de abiraterona), inhibidores de proteína de choque térmico 90 (HSP90), quimioterapia (por ejemplo, docetaxel, quimioterapia basada en platino tal como cisplatino, carboplatino, satraplatino y oxaliplatino, taxano, estramustina), prednisona o prednisolona, fármacos reductores de colesterol tales como estatinas, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), terapia de iARN, terapias basadas en células dendríticas, células tumorales completas genéticamente modificadas para secretar factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (también conocidas como GVAX), o cualquier combinación de estos. Aún en otra modalidad, el agente adicional es un inhibidor del receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib.

En una modalidad, el cáncer es cáncer de pulmón y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, radioterapia (por ejemplo, radioterapia torácica, terapia de radiación con partículas cargadas, quimioterapia con uracilo y tegafur y basada en platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, etc.) y vinoreblina, erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA®), anticuerpos antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, Cetuximab), inhibidores de molécula pequeña de tirosina quinasa, inhibidores directos de proteínas involucradas en la proliferación celular en el cáncer de pulmón, inhibidores de Aurora quinasa, termoterapia inducida por láser, terapia de iARN, células tumorales completas genéticamente modificadas para secretar factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (también conocidas como GVAX), o cualquier combinación de estos. Los tratamientos terapéuticos adicionales incluyen taxol o pemetrexed. Aún en otra modalidad, el agente adicional es un inhibidor del receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib. Las dosis de cualquiera de estas terapias se conocen en la técnica y pueden ajustarse en consecuencia con la terapia de combinación.

En una modalidad, el cáncer es cáncer de mama y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos contra Her-2, herceptina), quimioterapia adyuvante tal como quimioterapia con un solo agente o quimioterapia de combinación (por ejemplo, poliquimioterapias basadas en antraciclina y taxano, taxol, o trastuzumab específico para el objetivo con o sin manipulación endocrina con o sin PMRT, vinorelbina), adriamicina, ciclofosfamida, xeloda, taxotere, moduladores selectivos del receptor de estrógenos tales como tamoxifeno y raloxifeno, moduladores alostéricos del receptor de estrógenos tales como trilostano, radiación (por ejemplo, braquiterapia intersticial, dispositivo Mammosite, radiación externa conformacional tridimensional y radioterapia intraoperatoria), inhibidores de aromatasa que suprimen la síntesis corporal total (por ejemplo, anastrozol, exemestano y letrozol), terapia de iARN, análogos intravenosos de rapamicina que son inmunosupresores y antiproliferativos tale

como temsirolimus (CCI779), o cualquier combinación de estos. Una reseña de los métodos para realizar modelos tridimensionales de cultivo de tejidos in vitro de cáncer de mama se describe en Kim y otros, Breast Cancer Research Treatment 85(3): 281-91 (2004). Otros modelos in vivo e in vitro para probar los cánceres se conocen y pueden usarse para probar los anticuerpos descritos en la presente descripción. Aún en otra modalidad, el agente adicional es un inhibidor del receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), Sunitinib (SUTENT®), Sorafenib (NEXAVAR®), Axitinib, Pegaptanib y Pazopanib. Las dosis de cualquiera de estas terapias se conocen en la técnica y pueden ajustarse en consecuencia con la terapia de combinación.

En una modalidad, el cáncer es cáncer de colon y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es cirugía, terapia de radiación, y quimioterapia (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), levamisol, leucovorina o semustina (metil CCNU)), N-[2-(dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamida y otros fármacos anticancerígenos relacionados con carboxamida; inhibidores que no son de topoisomerasa II, irinotecán, topotecán liposomal, agentes anticancerígenos de la clase de los taxanos (por ejemplo, paclitaxel o docetaxel), un compuesto de la clase de ácido acético xantenona (por ejemplo, ácido 5,6-dimetilantenona-4-acético PMAA), laminarin, análogos de AMP cíclico sitio selectivos (por ejemplo, fosfato de 8-cloroadenosina 3',5'-cíclica), inhibidores piranoindólicos de Cox-2, inhibidores carbazólicos de Cox-2, inhibidores tetrahydrocarbazólicos de Cox-2, inhibidores indénicos de Cox-2, inhibidores localizados de NSAID (por ejemplo, ácidos antranílicos, aspirina (ácido 5-acetilsalicílico), azodisal sódico, ácidos carboheterocíclicos, carprofeno, clorambucilo, diclofenaco, fenbufeno, fenclufenaco, fenoprofeno, ácido flufenámico, flurbiprofeno, fluprofeno, furosemida, tiomalato de oro y sodio, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, ketoprofeno, lonazolac, loxoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefanámico, melfalán, naproxeno, penicilamina, ácidos fenilacéticos, ácidos propiónicos, ácidos salicílicos, salazosulfapiridina, sulindac, tolmetina, un NSAID pirazolona butazona propazona, meloxicam, oxicams, piroxicam, feldeno, piroxicam beta ciclodextrano, tenoxicam, etodolaco, y oxaprozina), un inhibidor de HER-2/neu, terapia de iARN, GM-CSF, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos anti-Her-2/neu, anticuerpos anti-CEA, A33 (HB 8779), 100-210 (HB 11764) y 100-310 (HB 11028)), erbitux, vectibix, terapia hormonal, pirimidinaminas, derivados de camptotecina (por ejemplo, CPT- 11), ácido folínico (FA), gemcitabina, Ara-C, agentes quimioterapéuticos a base de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, un inhibidor de fosfodiesterasa específica de cGMP, o cualquier combinación de estos. En una modalidad el tratamiento terapéutico adicional es una combinación de 5-FU, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX). En una modalidad, el tratamiento terapéutico adicional es una combinación de 5-FU, irinotecán y leucovorina (IFL). En una modalidad, el agente adicional es erbitux. En una modalidad, el agente adicional es vectibix. Aún en otra modalidad, el agente adicional es un inhibidor del receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib. Las dosis de cualquiera de estas terapias se conocen en la técnica y pueden ajustarse en consecuencia con la terapia de combinación.

En una modalidad, el cáncer es cáncer pancreático y el uno o más tratamientos terapéuticos adicionales es una combinación de tratamientos terapéuticos es cirugía, terapia de radiación (RT), fluorouracilo (5-FU) y RT, terapia sistémica, canulación, gemcitabina (GEMZAR®), gemcitabina y RT, cetuximab, erlotinib (TARCEVA®), quimiorradiación, o cualquier combinación de estos. Aún en otra modalidad, el agente adicional es un inhibidor del receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor de VEGF incluyen ranibizumab (LUCENTIS®), aflibercept (VEGF-Trap), sunitinib (SUTENT®), sorafenib (NEXAVAR®), axitinib, pegaptanib y pazopanib.

Los pacientes pueden evaluarse con respecto a los síntomas en uno o más de múltiples puntos de tiempo que incluyen antes, durante, y después de los regímenes de tratamiento. El tratamiento puede dar lugar a la mejoría de la afección del sujeto y puede evaluarse mediante la determinación de si uno o más de los factores siguientes se ha producido: disminución del tamaño tumoral, disminución de la proliferación celular, disminución de las cantidades de células, disminución de la neovascularización, aumento de la apoptosis, o disminución de la supervivencia de al menos una porción de las células que comprenden el trastorno proliferativo celular. Uno o más de estos eventos puede dar lugar, en algunos casos, a la eliminación parcial o total del cáncer y la prolongación de la supervivencia del paciente. Alternativamente, para los cánceres en estadio terminal, el tratamiento puede dar lugar a la detención de la enfermedad, mejor calidad de vida y/o prolongación de la supervivencia.

Ensayos funcionales

Las composiciones descritas en la presente descripción pueden evaluarse en una variedad de ensayos in vitro, in vivo y ex vivo. Cualquier ensayo adecuado conocido para un experto en la técnica puede usarse para monitorear tales efectos. Varias de estas técnicas se describen en la presente descripción.

Ensayo para la señalización y función de CD105

CD105 (endoglin) es un miembro de la familia de receptores de TGF- β que se expresa en células endoteliales en proliferación, y niveles normales de CD105 son necesarios para la proliferación de células endoteliales. CD105 se expresa fuertemente en la vasculatura angiogénica de tumores sólidos, participa en la angiogénesis/desarrollo vascular y es un receptor auxiliar del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). CD105 es una glucoproteína de membrana celular homodimérica que se expresa en células leucémicas y células endoteliales. Se han caracterizado dos isoformas

de CD105, L-endoglina (170 kDa) y S-endoglina (160 kDa), que difieren en la secuencia de aminoácidos de sus colas citoplasmáticas.

5 La expresión de CD105 aumenta por hipoxia celular a través de la producción del factor-1- α inducible por hipoxia (HIF-1- α) y protege a las células hipóxicas de la apoptosis. CD105 actúa para modular la señalización de múltiples complejos de receptores quinasas de la superfamilia de TGF- β , que incluyen receptores de TGF- β (TGF- β R), quinasas del tipo receptor de activina (ALK) y receptores de activina. En ausencia de CD105, la activación de los receptores de TGF- β da lugar a la fosforilación de proteínas SMAD que inhiben el crecimiento de células endoteliales. Sin embargo, la activación de CD105 por TGF- β modula la fosforilación de proteínas SMAD. El resultado final es la liberación de los efectos
10 inhibidores del crecimiento de la activación del receptor de TGF- β en células endoteliales.

La prevención de la activación de CD105 mediante un anticuerpo anti-CD105 actúa sinérgicamente con TGF- β para suprimir el crecimiento de células endoteliales. TGF- β puede estimular dos vías de señalización distintas de receptor de tipo I/SMAD con efectos contrarios en células endoteliales. La vía de señalización de TGF- β /ALK5 (A) conduce a la inhibición de la proliferación y la migración celular, mientras que la vía de TGF- β /ALK1 (B) induce la proliferación y la migración de células endoteliales. CD105, un receptor auxiliar de TGF- β , que se expresa altamente durante la angiogénesis, es esencial para la señalización de ALK1. En ausencia de CD105, la señalización de TGF- β /ALK5 predomina y mantiene el endotelio inactivo. La expresión de CD105 alta estimula la vía de ALK1 e inhibe indirectamente la señalización de ALK5, lo que promueve así el estado de activación de la angiogénesis.
15 20

En una modalidad no limitante, los anticuerpos quiméricos pueden evaluarse con respecto a la inhibición de la angiogénesis y la proliferación de células endoteliales. La unión de los anticuerpos antiendoglina quiméricos a HUVEC no impide la unión posterior de TGF- β a HUVEC. Por lo tanto, la supresión directa del crecimiento de células endoteliales por anticuerpos antiendoglina representa uno de los mecanismos subyacentes por los cuales se observan efectos antiangiogénicos y supresores de tumor in vivo. En otra modalidad, los anticuerpos quiméricos pueden evaluarse con respecto al bloqueo de la angiogénesis mediante la prevención de la fosforilación y/o señalización de Smad1/5/8. CD105 participa en la promoción de la angiogénesis a través de la señalización de la vía TGF- β /ALK1, la que a su vez involucra la disminución y/o bloqueo de la fosforilación de las proteínas Smad2/3. Aún en otra modalidad, los anticuerpos quiméricos pueden evaluarse con respecto al bloqueo de la angiogénesis mediante el aumento de la fosforilación y/o señalización de Smad2/3.
25 30

Los métodos y técnicas para ensayar el efecto de bloqueo o inhibidor de los anticuerpos quiméricos proporcionados en la presente descripción sobre la vía de señalización de TGF- β /ALK1 y/o la fosforilación de Smad1/5 incluyen, pero no se limitan a, técnicas moleculares conocidas. A modo de ejemplo, la transferencia Western con anticuerpos específicos para cualquiera de las proteínas en las vías de TGF- β /ALK5 o TGF- β /ALK1 puede usarse para determinar el efecto inhibidor y/o estimulador de los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción sobre las vías de TGF- β /ALK5 o TGF- β /ALK1. De manera similar, la detección de ARNm o la regulación del ARNm para las proteínas involucradas en las vías de TGF- β /ALK5 o TGF- β /ALK1 pueden usarse para ensayar el efecto inhibidor y/o estimulador de los anticuerpos quiméricos descritos en la presente descripción. Los métodos adicionales para el ensayo de la señalización celular para las vías de TGF- β /ALK5 o TGF- β /ALK1 se conocen en la técnica y se contemplan en la presente descripción.
35 40

La actividad de los anticuerpos antiendoglina quiméricos descritos en la presente descripción puede evaluarse mediante el uso de ensayos reconocidos en la técnica mediante, por ejemplo, ensayos de unión tales como ELISA, ELISA competitivos, resonancia de plasmones superficiales, y se efectúan en células HUVEC como se describe en más detalle más abajo.
45

Ensayos para la señalización y función de VEGF

50 Los anticuerpos que inhiben específicamente la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Fik-1) pueden evaluarse mediante el uso de ensayos de competencia y/o funcionales. Los ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de competencia basados en ELISA. En los ensayos de competencia, el VEGF se mezcla previamente o se combina con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, un exceso molar de 100 veces a 1000 veces) y se determina la capacidad de los anticuerpos de prueba de reducir la unión de VEGF a VEGFR2. VEGF puede etiquetarse previamente y detectarse directamente, o puede detectarse mediante el uso de un anticuerpo anti-VEGF (secundario) o un sistema de detección de anticuerpos secundarios y terciarios. Un formato ELISA de tal ensayo de competencia es un formato de este tipo, pero puede realizarse cualquier tipo de inmunoensayo de competencia.
55

La unión de VEGF a VEGFR2 en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (que incluye anticuerpos monoclonales anti-VEGF no bloqueadores) es el valor alto de control (100 %) en un ensayo de competencia de este tipo. En un ensayo de prueba, una reducción significa de la unión de VEGF a VEGFR2 en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo que inhibe significativamente la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Fik-1).
60

65 Otro ensayo de unión para identificar y/o confirmar que un anticuerpo inhibe la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Fik-1) es un ensayo de coprecipitación. Un ensayo de coprecipitación prueba la capacidad de un

anticuerpo de bloquear la unión de VEGF a uno o más receptores en solución. En un ensayo de este tipo, VEGF o VEGF etiquetado de manera detectable se incuban con una forma adecuada del receptor.

5 Existen muchos formatos para realizar los ensayos de inmunoprecipitación o coprecipitación. En el presente caso, una "forma adecuada del receptor" puede ser un receptor VEGFR2 o el dominio extracelular del receptor. La inmunoprecipitación requerirá, así como los reactivos estándar, la presencia de un anticuerpo contra un receptor VEGFR2 o un epítipo en el dominio extracelular del receptor distinto del sitio al cual se une el VEGF.

10 Independientemente del receptor adecuado, los ensayos de inmunoprecipitación o coprecipitación se realizan con controles. La capacidad de VEGF solo de unirse al receptor elegido puede confirmarse por precipitación en ausencia de un anticuerpo anti-VEGF. Pueden realizarse incubaciones en paralelo en presencia o ausencia de un anticuerpo con propiedades de unión conocidas para actuar como control. Los ensayos que usan un anticuerpo de control bloqueador y de control no bloqueador pueden ejecutarse en paralelo.

15 Después, cualquiera de las especies inmunológicas unidas se inmunoprecipitan, por ejemplo, mediante la incubación con una composición de inmunoprecipitación eficaz, tal como una composición de proteína A o microesferas de sefarosa con proteína A. Después, el precipitado se prueba para detectar la presencia de VEGF. Cuando el VEGF en la incubación inicial es VEGF etiquetado de manera detectable, tal como VEGF radioetiquetado, cualquier VEGF en los inmunoprecipitados puede detectarse directamente. Cualquier VEGF no etiquetado en los inmunoprecipitados puede detectarse por otros medios adecuados, por ejemplo, por separación en gel e inmunodetección con un anticuerpo anti-VEGF.

25 La capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de VEGF a un receptor de VEGF, tal como VEGFR2, en un ensayo de coprecipitación de este tipo puede cuantificarse fácilmente, aunque los resultados cualitativos también son valiosos. La cuantificación puede lograrse por medición directa del VEGF etiquetado o, por ejemplo, por análisis densitométrico del VEGF inmunodetectado. Por lo tanto, los anticuerpos que exhiben una capacidad reproducible, es decir, observada consistentemente, de inhibir la unión de VEGF a VEGFR2 pueden detectarse, y pueden elegirse los anticuerpos útiles de acuerdo con los criterios cuantitativos expuestos anteriormente.

30 Los anticuerpos anti-VEGF que no inhiben significativamente la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (Flt-1) también pueden identificarse fácilmente mediante la realización de ensayos de coprecipitación como se describió anteriormente, pero mediante el uso de VEGFR1 en lugar de VEGFR2. Por lo tanto, los anticuerpos anti-VEGF que inhiben la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (Flt-1) también pueden identificarse fácilmente mediante el uso de tales métodos.

35 Pueden usarse, además, ensayos funcionales para identificar y/o confirmar que un anticuerpo inhibe significativamente la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Flk-1). Estos se relacionan generalmente con la identificación de VEGFR2 como el receptor responsable de ciertas respuestas biológicas definidas. Aunque típicamente se usan menos que los ensayos de tipo competencia anteriores, que se realizan en sistemas libres de células y son más reproducibles, confiables, menos trabajosos y más económicos, los ensayos siguientes son no obstante útiles.

45 Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, puede identificarse mediante la prueba de la capacidad de inhibir el crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF (inhibición de la actividad mitogénica de VEGF). Cualquier ensayo adecuado puede emplearse mediante el uso de cualquiera de una variedad de células endoteliales en presencia de VEGF con o sin anticuerpos de prueba. Pueden ejecutarse ensayos duplicados en paralelo, tales como aquellos sin VEGF y aquellos con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueadores como no bloqueadores). El crecimiento de células endoteliales puede determinarse y cuantificarse con exactitud mediante cualquier medio aceptable para determinar la cantidad de células, que incluye ensayos colorimétricos.

50 Un anticuerpo con una capacidad de inhibir el crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF exhibirá generalmente una inhibición observada consistentemente del crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF de aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % más o menos. La inhibición en tales intervalos indicará un anticuerpo con propiedades suficientes para inhibir la angiogénesis in vivo. Los anticuerpos con actividad inhibidora más significativa no se excluyen de la invención.

60 Los ensayos funcionales adicionales para identificar anticuerpos incluyen ensayos para probar el bloqueo de la fosforilación inducida por VEGF. Cualquier ensayo adecuado puede emplearse mediante el uso de cualquiera de una variedad de células endoteliales que expresan cualquier forma de VEGFR2 fosforilable nativa o recombinante. Las células se incuban con VEGF en presencia o ausencia del anticuerpo a probar durante un período de tiempo adecuado. Pueden ejecutarse ensayos duplicados en paralelo, tales como aquellos sin VEGF y aquellos con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueadores como no bloqueadores).

65 Aún otros ensayos funcionales adicionales para identificar anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, de acuerdo con la presente invención son ensayos para probar la inhibición de la permeabilidad vascular inducida por

5 VEGF. Aunque puede usarse cualquier ensayo de este tipo, un ensayo adecuado es el ensayo de permeabilidad de Miles, en donde animales tales como cobayas se inyectan con un colorante, tal como colorante azul de Evan, y la aparición del colorante en la piel del animal se determina después de suministrar VEGF en presencia o ausencia de los anticuerpos de prueba. Pueden realizarse estudios duplicados en paralelo, tales como aquellos sin VEGF y aquellos con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueadores como no bloqueadores). La aparición de colorante en la piel del animal es típicamente en forma de manchas, tales como manchas azules, en el dorso del animal, las cuales pueden fotografiarse y medirse.

10 Ratones SCID / Desnudos

10 Un método para ensayar el crecimiento tumoral usa el ratón SCID, de la siguiente manera: se cosechan células de melanoma humano M21 subconfluentes, se lavan, y se resuspenden en PBS estéril (20 x 106 por ml). Los ratones SCID se inyectan por vía subcutánea con 100 µl de suspensión de células de melanoma humano M21 (2 x 106). Tres días después de la inyección de células tumorales, los ratones o bien no se tratan o se tratan por vía intravenosa o intraperitoneal (por ejemplo, 100 µg/ratón) con una o más composiciones de control o de prueba. Los ratones se tratan diariamente durante 24 días. El tamaño tumoral se mide con calibres y el volumen se estima mediante el uso de la fórmula $V = (L \times W^2)/2$, donde V es igual al volumen, L es igual a la longitud, y W es igual al ancho.

20 Un método para ensayar el crecimiento tumoral usa ratón desnudo, de la siguiente manera: Se implantan células tumorales MDA-MB-435 (0,4x106 células/ratón) en 50 µl de PBS por vía ortópica en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos hembras (de cinco a seis semanas de edad). Cuando los tumores alcanzan un volumen promedio de aproximadamente 50-80 mm3, los ratones se distribuyen aleatoriamente (al menos 10/grupo) y se inicia el tratamiento intravenoso o intraperitoneal con uno o más anticuerpos a 1 µg (0,05 mg/kg) por dosis, 10 µg (0,5 mg/kg), 100 µg (5 mg/kg) o 200 µg (10 mg/kg), o 100 µg de anticuerpo de control en 100 µl de PBS, o 100 µl de vehículo PBS dos veces por semana; en algunos estudios, puede evaluarse, además, un grupo no tratado. El tamaño tumoral se mide con calibres y el volumen se estima mediante el uso de la fórmula $V = (L \times W^2)/2$, donde V es igual al volumen, L es igual a la longitud, y W es igual al ancho.

30 Modelos de ratón singeneico BALB/c

30 Alternativamente, pueden utilizarse, además, modelos de ratón singeneico BALB/c para evaluar el crecimiento tumoral y la inhibición de este por los anticuerpos descritos en la presente descripción como se ejemplifica, por ejemplo, en Tsujie y otros, *Int. J. Oncology*, 29: 1087-1094 (2006).

35 Ratones quiméricos

40 Otro ensayo mide la angiogénesis en un modelo de ratón quimérico ratón:humano y se refiere como el ensayo de ratón quimérico. El ensayo se ha descrito en detalle por otros, y se ha descrito, además, en la presente descripción para medir la angiogénesis, la neovascularización, y la regresión de tejidos tumorales. Ver Yan, y otros. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:986-996.

45 El ensayo de ratón quimérico es un modelo de ensayo útil para la angiogénesis in vivo debido a que los injertos de piel trasplantados se asemejan mucho histológicamente a la piel humana normal y se produce neovascularización del tejido completo en donde crecen vasos sanguíneos humanos reales a partir de piel humana injertada en el tejido tumoral humano en la superficie de la piel humana injertada. El origen de la neovascularización en el injerto humano puede demostrarse por tinción inmunohistoquímica de la neovascularización con marcadores de células endoteliales específicos de humano.

50 El ensayo de ratón quimérico demuestra la regresión de la neovascularización en base tanto a la cantidad como a la extensión de la regresión del crecimiento de nuevos vasos. Además, es fácil monitorear los efectos sobre el crecimiento de cualquier tejido trasplantado en la piel injertada, tal como un tejido tumoral. Por último, el ensayo es útil debido a que existe un control interno para la toxicidad en el sistema de ensayo. El ratón quimérico se expone a cualquier reactivo de prueba, y por lo tanto la salud del ratón es una indicación de toxicidad. Otros modelos animales descritos en la presente descripción y conocidos en la técnica también pueden utilizarse en los métodos descritos en la presente descripción.

55 Ensayo en ojo de conejo

60 Otra medida de la angiogénesis es un modelo de ojo de conejo in vivo y se refiere como el ensayo en ojo de conejo. El ensayo en ojo de conejo se ha descrito en detalle por otros, y se ha usado para medir tanto la angiogénesis como la neovascularización en presencia de inhibidores angiogénicos como se ejemplifica en D'Amato y otros. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9): 4082-4085.

65 El ensayo en ojo de conejo es un modelo de ensayo reconocido para la angiogénesis in vivo debido a que el proceso de neovascularización, ejemplificado por el crecimiento de vasos sanguíneos de conejo desde el borde de la córnea hacia la córnea, se visualiza fácilmente a través de la córnea naturalmente transparente del ojo. Además, tanto la extensión

como la cantidad de estimulación o inhibición de la neovascularización o la regresión de la neovascularización pueden monitorearse fácilmente en el tiempo.

5 Por último, el conejo se expone a cualquier reactivo de prueba, y por lo tanto la salud del conejo es una indicación de la toxicidad del reactivo de prueba.

10 Brevemente, se realizan ensayos en membrana corioalantoica de pollo (CAM) y los efectos sobre la vasculatura en desarrollo se registran 48 horas después de la implantación de un gránulo de carboximetilcelulosa al 0,5 % que contiene uno o más compuestos de control o de prueba. La neovascularización de la córnea se induce por un gránulo implantado de poli(hidroxietil metacrilato) (Hydron; Interferon Sciences, New Brunswick, NJ) que contiene 650 ng del potente factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) de proteína angiogénica unido a sucralfato (sacarosa aluminio sulfato; Bukh Meditec, Copenhagen). La adición de sucralfato al gránulo protege al bFGF de la degradación y proporciona su liberación lenta, lo que produce así angiogénesis agresiva consistente que es más pronunciada que la inducida por bFGF / Hydron solo. La liberación de bFGF a partir de gránulos que contienen sucralfato/Hydron puede detectarse in vitro hasta 4 días después de formar los gránulos en comparación con solo 1 día para los gránulos con Hydron solo. Los gránulos se preparan mediante la mezcla de 110 μ l de solución salina que contiene 12 μ g de bFGF recombinante (Takeda, Osaka) con 40 mg de sucralfato; esta suspensión se añade a 80 μ l de Hydron al 12 % (p/vol) en etanol. Después se transfieren con pipeta alícuotas (10 μ l) de esta mezcla a clavijas de teflón y se dejan secar para producir aproximadamente 17 gránulos.

20 Se implanta un gránulo en los microbolsillos corneales de cada ojo de un conejo New Zealand White hembra anestesiado, 2 mm a partir del limbo, seguido de una sola aplicación tópica de ungüento de eritromicina en la superficie de la córnea. El examen histológico en días consecutivos demuestra el crecimiento progresivo de los vasos sanguíneos en la córnea hacia el gránulo con observación solamente de células inflamatorias escasas. Esta respuesta angiogénica no se altera por inmunosupresión grave con irradiación corporal total, y los gránulos con sucralfato solo no inducen la angiogénesis. Los nuevos vasos se inducen principalmente por el bFGF en lugar de por inflamación. Los animales se alimentan diariamente a partir de 2 días después de la implantación por lavado gástrico con uno o más compuestos suspendidos en carboximetilcelulosa al 0,5 % o vehículo solo. Los animales inmunosuprimidos reciben irradiación corporal total de 6 Gy durante 6 minutos inmediatamente antes de la implantación de los gránulos. Esta dosis de radiación da lugar a una leucocitopenia marcada con reducción >80 % del recuento leucocitario en el día 2 y reducción >90 % en el día 3, resultados que son consistentes con informes previos.

35 Los animales se examinan con una lámpara de hendidura un día sí y otro no de manera enmascarada por el mismo especialista de córnea (M.S.L.). El área de neovascularización de la córnea se determina por medición con un retículo de la longitud del vaso (L) desde el limbo y la cantidad de horas del reloj (C) del limbo involucradas. Se usa una fórmula para determinar el área de un segmento de banda circular: $C/12 \times 3,1416 [r^2 - (r - L)^2]$, donde $r = 6$ mm, el radio medido de la córnea del conejo. Se mide la banda contigua uniforme de neovascularización adyacente al gránulo, así, la inhibición total de la neovascularización puede evaluarse.

40 Ensayos de angiogénesis en ratón con tapón de Matrigel

45 Para confirmar los efectos de una composición sobre la angiogénesis, puede usarse un ensayo de angiogénesis en ratón con tapón de Matrigel. Varios factores de crecimiento (por ejemplo, IGF-1, bFGF o VEGF) (250 ng) y heparina (0,0025 unidades por/ml) se mezclan con Matrigel reducido con factor de crecimiento como se describió previamente (Montesano, y otros, J. Cell Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson, y otros, J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141). Las composiciones descritas en la presente descripción o los anticuerpos de control pueden incluirse en las preparaciones de Matrigel mediante la utilización de uno o más grupos de dosis de animales. En los experimentos de control, el Matrigel se prepara en ausencia de factores de crecimiento. Los ratones se inyectan por vía subcutánea con 0,5 ml de la preparación de Matrigel y se deja incubar durante una semana. Después del período de incubación, los ratones se sacrifican y los tapones de Matrigel polimerizado se extraen quirúrgicamente. La angiogénesis dentro de los tapones de Matrigel se cuantifica por dos métodos establecidos, que incluyen análisis inmunohistoquímico y contenido de hemoglobina (Furstenberger, y otros, Lancet. 2002, 3:298-302; Volpert, y otros, Cancer Cell 2002, 2(6):473-83; y Su, y otros, Cancer Res. 2003, 63:3585-3592). Para el análisis inmunohistoquímico, los tapones de Matrigel se incrustan en OCT, se congelan instantáneamente y se preparan secciones de 4 μ m. Las secciones congeladas se fijan en metanol/acetona (1:1). Las secciones congeladas se tiñen con anticuerpo policlonal dirigido a CD31. La angiogénesis se cuantifica mediante los recuentos de la densidad microvascular dentro de 20 campos microscópicos de alta potencia (200X).

60 El contenido de hemoglobina puede cuantificarse como se describió previamente (Schnaper, y otros, J. Cell Physiol. 1993, 256:235-246; Montesano, y otros, J. Cell Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson, y otros, J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141; y Gigli, y otros, J. Immunol. 1986, 100:1154-1164). Los implantes de Matrigel se congelan instantáneamente en hielo seco y se liofilizan durante la noche. Los implantes secos se resuspenden en 0,4 ml de saponina al 1,0 % (Calbiochem) durante una hora, y se rompen por pipeteo vigoroso. Las preparaciones se centrifugan a 14.000 X g durante 15 minutos para eliminar cualquier material particulado. Después, la concentración de hemoglobina en el sobrenadante se determina directamente por medición de la absorbancia a 405 nm y se compara con una concentración estándar de hemoglobina purificada.

Métodos para ensayar la migración celular

5 Los ensayos de migración celular se han descrito en la literatura, por ejemplo, en Brooks, y otros, J. Clin. Invest 1997, 99:1390-1398 y los métodos para medir la migración celular son conocidos para los expertos en la técnica. En un método para medir la migración celular descrito en la presente descripción, las membranas de las cámaras de migración con pocillos de transferencia se revisten con sustrato (en la presente descripción, endoglina y/o VEGF), los pocillos de transferencia se lavan, y los sitios de unión no específica se bloquean con BSA. Las células tumorales de cultivos subconfluentes se cosechan, se lavan, y se resuspenden en amortiguador de migración en presencia o ausencia de los anticuerpos de ensayo. Después que las células tumorales se dejan migrar a la parte inferior de las membranas de los pocillos de transferencia revestidas, las células que se mantienen en la parte superior de la membrana se eliminan y las células que migran a la parte inferior se tiñen con violeta cristal. Después, la migración celular se cuantifica mediante recuentos celulares directos por campo microscópico.

10 Métodos para ensayar la proliferación celular

15 La proliferación celular puede ensayarse mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica. Como se describe en la presente descripción, células humanas endoteliales (HUVEC) subconfluentes pueden resuspenderse en amortiguador de proliferación que contiene suero bajo (5,0 %) en presencia o ausencia de CM (25 µl) de células ECV o ECVL, y las células endoteliales se dejan proliferar durante 24 horas. La proliferación puede cuantificarse por medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial mediante el uso de un estuche de ensayo WST-1 disponible en el mercado (Chemicon). Además, como se describe en la presente descripción, la proliferación puede cuantificarse por medición de la incorporación de ³H mediante el uso de métodos estándar. (She y otros, Int. J. Cancer, 108: 251-257 (2004)).

20 Otros métodos para evaluar la proliferación celular se conocen en la técnica y se contemplan en la presente descripción. Otros ejemplos no limitantes se describen en más detalle en los ejemplos.

Métodos para inducir CDC, ADCC y opsonización

30 Varias terapias se han dirigido a aumentar la respuesta inmunitaria natural del cuerpo a células transformadas. Los métodos efectores convencionales incluyen citólisis dependiente del complemento ("CDC"), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") y fagocitosis (depuración por el sistema reticuloendotelial después de revestir la célula objetivo con inmunoglobulina). Se conoce que en presencia de anticuerpos, ciertas células efectoras, tales como las células linfoides que tienen receptores unidos a la superficie para las regiones Fc de los anticuerpos, median una reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") contra células objetivo. Por medio de la ADCC, estas células efectoras ejercen actividad citolítica contra tales células objetivo.

35 Dos tipos de reacciones de ADCC se han demostrado in vitro. En las reacciones de ADCC clásicas, las células efectoras se unen a células objetivo revestidas con anticuerpos y posteriormente causan la citólisis de las células objetivo (A. H. Greenberg y otros, "Characteristics Of The Effector Cells Mediating Cytotoxicity Against Antibody-Coated Target Cells," Immunology, 21, p. 719 (1975)). Esta unión entre célula efectora y objetivo es el resultado de la interacción de la región Fc del anticuerpo que reviste la célula objetivo y el receptor de Fc de la célula efectora. Una desventaja de este tipo de reacción de ADCC es que puede dificultarse por complejos de antígeno y anticuerpo circulantes, asociados frecuentemente con varias enfermedades, los cuales compiten con el anticuerpo unido a las células objetivo por los receptores de Fc de las células efectoras (I. C. M. MacLennan, "Competition For Receptors For Immunoglobulin On Cytotoxic Lymphocytes," Clin. Exp. Immunol., 10, p. 275 (1972)). Debido a este inconveniente de la ADCC clásica, puede utilizarse un segundo tipo de reacción de ADCC - ADCC dirigida por anticuerpos. En la ADCC dirigida por anticuerpos, el anticuerpo específico para el objetivo se une primero a la célula efectora y después el complejo resultante se "dirige," por medio del anticuerpo, a su antígeno específico en la superficie de la célula objetivo. De manera ventajosa, la ADCC dirigida por anticuerpos puede no verse afectada por la presencia de complejos de antígeno y anticuerpo circulantes en el sistema huésped. La interacción entre anticuerpos y células efectoras por medio de la unión de región Fc/receptor de Fc es normalmente débil. Y, en algunos casos, los anticuerpos no se mantienen asociados con las células efectoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la lisis de las células objetivo. En vista de este problema potencial, los anticuerpos se han unido a las células efectoras mediante el uso de tratamiento previo con polietilenglicol y una mezcla de aceites de ftalato (J. F. Jones y D. M. Segal, "Antibody-Dependent Cell Mediated Cytolysis (ADCC) With Antibody-Coated Effectors: New Methods For Enhancing Antibody Binding And Cytolysis," J. Immunol., 125, pp. 926-33 (1980)). La aplicabilidad de este método para tratamientos in vivo, sin embargo, puede verse disminuida por los efectos tóxicos que cualquier residuo de polietilenglicol y aceite de ftalato en el complejo de anticuerpo y célula efectora pueda tener sobre el cuerpo.

40 Alternativamente, se ha propuesto un método para aumentar la ADCC dirigida por anticuerpos mediante quimioterapia adyuvante con fármacos citotóxicos (I. R. Mackay y otros, "Effect On Natural Killer And Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Of Adjuvant Cytotoxic Chemotherapy Including Melphalan In Breast Cancer," Cancer Immunol. Immunother., 16, pp. 98-100 (1983)). Los ensayos para probar la ADCC se conocen bien en la técnica, tales como por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,756,097.

45 En consecuencia, las presentes modalidades proporcionan anticuerpos que pueden unirse a células que tienen una

función en la neovascularización o angiogénesis o que pueden aumentar la fagocitosis y la muerte de las células y de este modo aumentar la protección in vivo. Se proporcionan, además, otros anticuerpos y fragmentos funcionales de estos que inmunorreaccionan, se unen específicamente a, o se unen preferentemente a un sitio de unión o epítipo al que tales anticuerpos pueden unirse y pueden tener el mismo efecto.

5

Los anticuerpos también pueden ser opsónicos, o exhibir actividad de opsonización, para células que tienen una función en la neovascularización o angiogénesis (por ejemplo, células endoteliales). Como reconocen los expertos en la técnica, "actividad de opsonización" se refiere a la capacidad de una opsonina (generalmente un anticuerpo o el factor sérico C3b) de unirse a un antígeno o receptor celular para promover la unión del antígeno o receptor celular a un fagocito y de este modo aumentar la fagocitosis. Ciertas células se vuelven extremadamente atractivas para los fagocitos tales como los neutrófilos y macrófagos cuando se revisten con un anticuerpo opsónico y su velocidad de depuración del torrente sanguíneo aumenta sorprendentemente. La actividad de opsonización puede medirse de cualquier manera convencional como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 6,610,293.

10

En otra modalidad no limitante, un paciente que tiene un trastorno neovascular o un trastorno dependiente de la angiogénesis desprende antígenos/péptidos (por ejemplo, endoglina) de la angiogénesis. Estos antígenos/péptidos pueden ser "antígenos asociados a tumor." Tales pacientes pueden recibir la administración sistémica de un anticuerpo para el antígeno/péptido (por ejemplo, endoglina) y pueden iniciar cualquiera de las vías descritas en la presente descripción para inducir CDC, ADCC, opsonización, o cualquier forma de muerte mediada por células.

15

20

Ensayos adicionales

Otros ensayos conocidos en la técnica pueden usarse, además, para probar el efecto de las composiciones descritas en la presente descripción tales como, por ejemplo, los descritos en los ejemplos más abajo.

25

Envases y estuches

Aún en modalidades adicionales, la presente solicitud se refiere a estuches para el uso con los compuestos descritos anteriormente. Los anticuerpos quiméricos que se unen preferentemente a la endoglina y los anticuerpos que se unen preferentemente a VEGF pueden proporcionarse en un estuche. Los estuches pueden incluir uno o más medios de envase adecuados.

30

El medio de envase de los estuches incluirá generalmente al menos un frasco, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/u otro medio de envase, en el que puede colocarse al menos un polipéptido, y/o preferentemente, dividirse en alícuotas de manera adecuada. Los estuches pueden incluir un medio para contener al menos una proteína de fusión, una porción detectable, una molécula reportera, y/o cualquier otro recipiente de reactivo en confinamiento estrecho para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico para inyección y/o moldeados por soplado en los que se retienen los frascos deseados. Los estuches pueden incluir, además, material impreso para el uso de los materiales en el estuche.

35

40

Los envases y estuches pueden incluir, además, un agente amortiguador, un conservante y/o un agente estabilizante en una formulación. Cada componente del estuche puede encerrarse dentro de un recipiente individual y la totalidad de los diversos recipientes pueden estar dentro de un solo envase. Los estuches pueden diseñarse para el almacenamiento en frío o el almacenamiento a temperatura ambiente.

45

Además, las preparaciones pueden contener estabilizantes para aumentar la vida en estante de los estuches e incluyen, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA). Cuando las composiciones se encuentran liofilizadas, el estuche puede contener preparaciones adicionales de soluciones para reconstituir las preparaciones liofilizadas. Las soluciones de reconstitución aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato (PBS) farmacéuticamente aceptable.

50

Además, los envases o estuches proporcionados en la presente descripción también pueden incluir cualquiera de las otras porciones proporcionadas en la presente descripción tales como, por ejemplo, una o más moléculas reporteras y/o una o más porciones/agentes detectables.

55

Los envases y estuches pueden incluir, además, uno o más componentes para un ensayo, tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA. Las muestras a probar en esta solicitud incluyen, por ejemplo, sangre, plasma, secciones de tejido/tumor y secreciones, orina, linfa, y productos de estos. Los envases y estuches pueden incluir, además, uno o más componentes para la recolección de una muestra (por ejemplo, una jeringa, una taza, un hisopo, etc.).

60

Los envases y estuches pueden incluir, además, una etiqueta que especifica, por ejemplo, una descripción del producto, el modo de administración y/o la indicación de tratamiento. Los envases proporcionados en la presente descripción pueden incluir cualquiera de las composiciones como se describe en la presente descripción. El envase puede incluir, además, una etiqueta para tratar varias formas de cáncer y sus metástasis.

65

El término "material de envasado" se refiere a una estructura física que alberga los componentes del estuche. El material de envasado puede mantener los componentes en estado estéril y puede elaborarse a partir de material usado

comúnmente para tales propósitos (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, etc.). La etiqueta o inserto de envase puede incluir instrucciones escritas apropiadas. Por lo tanto, los estuches pueden incluir, además, etiquetas o instrucciones para el uso de los componentes del estuche en cualquier método descrito en la presente descripción. Un estuche puede incluir un compuesto en un paquete, o dispensador junto con instrucciones para administrar el compuesto en un método descrito en la presente descripción.

Se proporcionan, además, estuches que utilizan los métodos y ensayos de diagnóstico descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, un estuche comprende reactivos para la detección de un gen o genes cuyos niveles de expresión se han correlacionado con la sensibilidad o la resistencia a un inhibidor de la angiogénesis en una muestra de células cancerosas de un paciente. En algunas modalidades, el gen o genes se seleccionan de VEGF, receptor de VEGF, y CD105. En algunas modalidades, el estuche comprende VEGF. En algunas modalidades, el estuche comprende receptor de VEGF. En algunas modalidades, el estuche comprende CD105. En algunas modalidades, el estuche comprende al menos dos de VEGF, receptor de VEGF, y CD105. En algunas modalidades, el estuche comprende al menos dos genes que se han correlacionado con sensibilidad a un inhibidor de la angiogénesis. En algunas modalidades, el estuche comprende al menos dos genes que se han correlacionado con resistencia a un inhibidor de la angiogénesis. En algunas modalidades, el estuche comprende al menos un gen que se ha correlacionado con sensibilidad a un inhibidor de la angiogénesis y un gen que se ha correlacionado con resistencia a un inhibidor de la angiogénesis.

Aún en modalidades adicionales, un estuche comprende reactivos para la detección de los niveles de expresión de VEGF, receptor de VEGF, y CD105 en una muestra de células tumorales de un paciente a tratar; y una dosis o dosis de un inhibidor, que incluye pero no se limita a los anticuerpos descritos en la presente descripción, en una variedad de formas de dosificación, tales como cápsulas, comprimidos, cápsulas de gel, polvos para suspensión, etc. Se contempla, además, que los estuches que contienen reactivos para la detección de los niveles de expresión de VEGF, receptor de VEGF, y CD105 en una muestra de células tumorales de un paciente a tratar comprenderán, además, cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente de los estuches para la administración conjunta de al menos un inhibidor de la angiogénesis adicional.

Las instrucciones pueden incluir instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción que incluyen métodos de tratamiento. Las instrucciones pueden incluir, además, indicaciones de un criterio de valoración clínico satisfactorio o cualquiera de los síntomas adversos que pueden producirse, o información adicional requerida por las agencias reguladoras tales como la Administración de alimentos y fármacos para el uso en un sujeto humano.

Las instrucciones pueden estar en "material impreso," por ejemplo, en papel o cartón dentro de o fijado al estuche, o en una etiqueta fijada al estuche o material de envasado, o unido a un frasco o tubo que contiene un componente del estuche. Las instrucciones pueden incluirse, además, en un medio legible por ordenador, tal como un disco (disco flexible o disco duro), CD óptico tal como CD o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM, punta IC e híbridos de estos tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos.

40 EJEMPLOS

La solicitud puede entenderse mejor en referencia a los ejemplos no limitantes siguientes, que se proporcionan como modalidades ilustrativas de la solicitud.

45 Ejemplo 1

Análisis BIAcore (Resonancia de plasmones superficiales: SPR)

50 Unión de anticuerpos antiendoglina quiméricos

La afinidad de los anticuerpos puede evaluarse mediante el uso de, por ejemplo, análisis BIACORE mediante el uso de protocolos estándar. Brevemente, un anticuerpo anti-etiqueta de histidina se acopla a un chip de BIAcore para la captura de endoglina humana recombinante etiquetada con His la que a su vez se usará para medir la unión de un anticuerpo antiendoglina quimérico. El desarrollo del ensayo de SPR se realiza en un mínimo de 2 lotes de chip preparativos más 8 lotes analíticos. Los parámetros siguientes se evalúan en el desarrollo del ensayo:

(a) Acoplamiento del anticuerpo antihistidina a chips CM5

60 Un anticuerpo anti-etiqueta de his se acopla a un chip CM5 de BIAcore por química de amina convencional que usa EDC/NHS. Las condiciones de reacción (concentración y pH) se optimizarán

(b) Unión de la endoglina humana y regeneración del chip biosensor

65 Se prueban las condiciones para la unión de la endoglina humana y la regeneración del chip mediante el uso de varios amortiguadores (en base a la experiencia previa) para eluir el anticuerpo unido. Una vez que se ha desarrollado un

método candidato para la regeneración, la capacidad de unión y la señal de fondo de la superficie de un chip individual se miden en al menos 25 ciclos. El objetivo es obtener en promedio un aumento de la señal de fondo < 10 RU por ciclo y una disminución de la capacidad < 1 % por ciclo.

5 (c) Unión de la endoglina humana

La respuesta a la dosis de la endoglina humana se mide para determinar una concentración adecuada para acercarse a la unión máxima.

10 (d) Unión del anticuerpo antiendoglina quimérico

La respuesta a la dosis del anticuerpo antiendoglina quimérico se mide para determinar un intervalo adecuado para los experimentos de unión cinéticos o en equilibrio (que pueden incluir la comparación de las constantes cinéticas relativas, k_a y k_d o una comparación de la potencia relativa mediante el método de líneas paralelas).

15

(e) Experimentos de validación previa

Los experimentos de unión se repiten al menos tres veces en las condiciones elegidas mediante el uso de chips diferentes, celdas de flujo diferentes y en ocasiones diferentes para obtener información preliminar acerca de la precisión y la exactitud de las mediciones. Todos los experimentos BIAcore se llevan a cabo a 25 °C en amortiguador de corrida HBS-EP.

20

Unión del anticuerpo anti-VEGF

25

La afinidad de los anticuerpos puede evaluarse mediante el uso de, por ejemplo, análisis BIACORE mediante el uso de protocolos estándar. Brevemente, el anticuerpo antietiqueta de histidina se acopla a un chip de BIAcore para la captura de VEGF humano recombinante etiquetado con His que a su vez se usará para medir la unión de un anticuerpo anti-VEGF. El desarrollo del ensayo de SPR se realiza en un mínimo de 2 lotes de chip preparativos más 8 lotes analíticos. Los parámetros siguientes se evalúan en el desarrollo del ensayo:

30

(a) Acoplamiento del anticuerpo antihistidina a chips CM5

Un anticuerpo antietiqueta de his se acopla a un chip CM5 de BIAcore por química de amina convencional que usa EDC/NHS. Las condiciones de reacción (concentración y pH) se optimizarán.

35

(b) Unión del VEGF humano y regeneración del chip biosensor

Se prueban las condiciones para la unión del VEGF humano y la regeneración del chip mediante el uso de varios amortiguadores (en base a la experiencia previa) para eluir el anticuerpo unido. Una vez que se ha desarrollado un método candidato para la regeneración, la capacidad de unión y la señal de fondo de la superficie de un chip individual se miden en al menos 25 ciclos. El objetivo es obtener en promedio un aumento de la señal de fondo < 10 RU por ciclo y una disminución de la capacidad < 1 % por ciclo.

40

(c) Unión del VEGF humano

45

La respuesta a la dosis del VEGF humano se mide para determinar una concentración adecuada para acercarse a la unión máxima.

(d) Unión del anticuerpo anti-VEGF

50

La respuesta a la dosis del anticuerpo anti-VEGF quimérico se mide para determinar un intervalo adecuado para los experimentos de unión cinéticos o en equilibrio (que pueden incluir la comparación de las constantes cinéticas relativas, k_a y k_d o una comparación de la potencia relativa mediante el método de líneas paralelas).

55

(e) Experimentos de validación previa

Los experimentos de unión se repiten al menos tres veces en las condiciones elegidas mediante el uso de chips diferentes, celdas de flujo diferentes y en ocasiones diferentes para obtener información preliminar acerca de la precisión y la exactitud de las mediciones. Todos los experimentos BIAcore se llevan a cabo a 25 °C en amortiguador de corrida HBS-EP.

60

Ejemplo 2

ELISA para la unión del anticuerpo antiendoglina quimérico

65

Puede usarse un ELISA para ensayar la unión de los anticuerpos antiendoglina quiméricos a la endoglina. Brevemente, se realiza un ELISA de acuerdo con las etapas siguientes:

- 5 1. Revestir una placa Nunc Maxisorp con MAB9811-01 (anticuerpo policlonal antiendoglina) a 1500 ng/ml en PBS, 100 µl/pocillo. Cubrir la placa con un sellador e incubar durante la noche (16-24 horas) a 4 °C.
2. Lavar la placa 2X con -200 µl de PBS (sin Tween).
- 10 3. Añadir 200 µl/pocillo de solución de bloqueo de BSA (BSA al 1 %) e incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar la placa 3X con PBS que contiene Tween (PBS-T) mediante el uso del lavador de placas BioTek.
- 15 5. Añadir 100 µl/pocillo de CD105 (R&D Systems Cat 1097-EN) a 100 ng/ml en PBS-T con BSA al 0,1 % e incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar la placa 3X con PBS-T mediante el uso del lavador de placas BioTek.
- 20 7. En los pocillos de prueba: añadir 100 µl/pocillo de anticuerpos antiendoglina quiméricos a 20, 10, 4, 2, 1, 0,5 y 0,2 ng/ml (diluidos en PBS-T con BSA al 0,1 %) e incubar 60 minutos a temperatura ambiente. En los pocillos de control negativo: añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo de control del mismo isotipo.
8. Lavar la placa 3X con PBS-T mediante el uso del lavador de placas BioTek.
- 25 9. Añadir 100 µl/pocillo de IgG de carnero antihumano conjugada a HRP (Jackson Immunoresearch), diluido 1:10.000 en PBS-T con BSA al 0,1 % a todos los pocillos; incubar 30-60 minutos a temperatura ambiente.
10. Lavar la placa 5X con PBS-T mediante el uso del lavador de placas BioTek.
- 30 11. Añadir 100 µl/pocillo de solución de sustrato TMB e incubar al descubierto en la oscuridad durante 15 minutos.
12. Detener la reacción por adición de 100 µl/pocillo de solución de parada de TMB.

35 Las muestras se analizan por triplicado y se lee la densidad óptica para construir una curva estándar y determinar la constante de unión. El análisis estadístico se realiza mediante el uso de la prueba t de Student u otra prueba estándar.

Se entenderá que puede usarse un protocolo similar para probar la unión de los anticuerpos a VEGF.

Ejemplo 3

40 Aidez de los anticuerpos y cantidad de epítomos disponibles en células que expresan endoglina.

La avidéz de los anticuerpos y la cantidad de epítomos disponibles en células que expresan endoglina pueden evaluarse mediante la utilización de análisis de diagramas de Scatchard mediante el uso de protocolos estándar.

45 Brevemente, se llevan a cabo análisis de diagramas de Scatchard de la unión directa de anticuerpos antiendoglina quiméricos radioetiquetados a células leucémicas KM-3 que expresan endoglina y HUVEC subconfluentes en proliferación. Los anticuerpos antiendoglina purificados se radioetiquetan individualmente con ¹²⁵I mediante el uso de Iodo-Gen y de acuerdo con métodos estándar conocidos para los expertos en la técnica. Los anticuerpos antiendoglina quiméricos radioetiquetados se ensayan para determinar los átomos de yodo por molécula de IgG en promedio, respectivamente. Se llevan a cabo experimentos de titulación mediante el uso de una cantidad fija (0,1 µg) de cada AcM etiquetado con ¹²⁵I e incrementos seriados de 2 veces de células KM-3 o HUVEC que expresan endoglina para determinar la actividad de unión al antígeno. El análisis del diagrama de Scatchard de los datos de unión se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos. Una constante de equilibrio y un número máximo promedio de AcM unido/célula se estiman mediante este análisis.

55

Ejemplo 4

Ensayo de transferencia Western para la actividad de bloqueo

60 La capacidad de los anticuerpos antiendoglina quiméricos de bloquear la activación estimulada por CD105 de células que expresan CD105 puede ensayarse por medio de transferencia Western para detectar la fosforilación de las proteínas involucradas en la vía de señalización de CD105.

Los análisis de transferencia Western se realizan para identificar Smad1/5/8 o Smad2 fosforiladas de acuerdo con

técnicas de transferencia Western conocidas. Los anticuerpos PSmad1 y PSmad2 reconocen específicamente Smad1/5 fosforilada o Smad2 fosforilada en células endoteliales no transfectadas. Los anticuerpos primarios contra Smad1, Smad2, Smad5, Id1 (Santa Cruz) y endoglina se utilizan para detectar moléculas en las muestras. La detección se realiza mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL).

5

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento de HUVEC y ensayo de incorporación de 3H-timidina

10 Se dispone de una serie de ensayos para evaluar la inhibición del crecimiento celular.

En un ejemplo, las HUVEC se cultivan en matraces de 75-cm² (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) en una incubadora de CO₂ a 37 °C en condiciones subconfluentes. Las células se desprenden por incubación con solución salina equilibrada de Hanks con EDTA 15 mM en amortiguador HEPES 25 mM, pH 7,3, a 37 °C durante 15 min. Después de lavar dos veces con PBS frío, las células se resuspenden en medio de crecimiento de células endoteliales a una concentración de 25.000 células/ml. En experimentos adicionales, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se suspenden y se cultivan en un medio de crecimiento de células endoteliales libre de FBS y extractos de cerebro bovino. Una alícuota de 200 µl de suspensión de células se siembra en cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos. Las células se cultivan a 37 °C en una incubadora de CO₂ durante la noche antes de añadir anticuerpos antiendoglina quiméricos, anticuerpos anti-VEGF, una combinación de anticuerpos antiendoglina quiméricos y anticuerpos anti-VEGF, IgG de control o TGF-β1 por triplicado. Las placas de cultivo se mantienen en la incubadora durante 72 h, durante las cuales se reemplaza medio fresco y anticuerpos o controles cada 24 h. Se añade 3H-timidina (1 µCi) a cada pocillo y las placas se incuban durante 20 h. Las células se lavan con PBS seguido de tratamiento con tripsina y EDTA (tripsina al 0,05 %, EDTA 0,53 mM) a 100 µl/pocillo a 37 °C durante 15 min. Las células se cosechan en filtros de fibra de vidrio (Wallac Printed FiltermatA) mediante el uso de Harvester 96 (TOMTEC, Hamden, CT) y la radioactividad de 3H se determina en un contador de centelleo y luminiscencia Trilux 1540 MicroBeta Liquid (Wallac, Turku, Finlandia).

15

20

25

Ejemplo 6

30

Inhibición del crecimiento de HUVEC mediante ensayo con MTS

Se dispone de una serie de ensayos para evaluar la inhibición del crecimiento de células endoteliales.

En un ejemplo, las HUVEC se cultivan en placas de 96 pocillos (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) en una incubadora de CO₂ a 37 °C en condiciones subconfluentes a 5000 células por pocillo en medio EGM-2 (Clonetics, Walkersville, MD) que contiene suero fetal bovino al 0,5 % y 30 ng/ml de VEGF. Se deja que las células se adhieran al matraz de cultivo durante al menos 24 horas y después se incuban con anticuerpo anti-VEGF con o sin anticuerpo antiendoglina quimérico. Las placas de cultivo se mantienen en la incubadora durante 72 h, durante las cuales el medio fresco y los anticuerpos o controles se reemplazan cada 24 h. Después de tres días de tratamiento con anticuerpo, se añade el compuesto MTS tetrazolio a los pocillos durante una hora y la absorbancia se cuantifica a 490 nm de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Todas las muestras se analizan por triplicado.

40

45

Ejemplo 7

Ensayo de inhibición de la migración celular

La migración (quimioquinesis) como una medida de la proliferación y activación celular se mide mediante el uso de una cámara de Boyden.

50

55

Brevemente, la migración celular se evalúa de la siguiente manera: un filtro Costar nucleopore (poro de 8 µm) se reviste con fibronectina durante la noche a 4 °C. La cámara se lava con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y la cámara inferior se llena con DMEM con o sin suero y con o sin TGF-β3. Las células se tripsinizan y se suspenden a una concentración final de 50.000 células/ml en DMEM en presencia de un anticuerpo de control, un anticuerpo antiendoglina quimérico, un anticuerpo anti-VEGF o una combinación de estos. Se añade una alícuota de 150 µl de la suspensión de células a la cámara superior y se incuban a 37 °C. Después de 16 h, las células se lavan y la superficie superior se limpia para eliminar las células que no migran. Las membranas se fijan en metanol, se lavan con agua, se tiñen y las cantidades de células presentes en la superficie inferior se cuentan.

60

Ejemplo 8

Ensayo de ADCC

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden evaluarse con respecto a su capacidad de generar células asesinas naturales (NK) activadas por IL-2 y de inducir ADCC mediante el uso, por ejemplo, de los protocolos siguientes.

5 Aislamiento de NK y generación de células NK activadas por IL-2

Las PBMC se aíslan y se dejan reposar durante 24 h a 4 °C en RPMI con FBS al 10 %. Después, las PBMC se colocan en RPMI con FBS al 2 % (volumen total = 50 ml), y 10 ml de la suspensión de células se siembran en una placa petri. Las PBMC se incuban durante 2 h a 37 °C y las células no adherentes se recolectan. Las células NK se cultivan a 8 X 10⁶/ml con 1000 U/ml de IL-2 durante 48 h, seguido de cultivo normal durante 5-8 días antes de usarlas en un ensayo.

Ensayos de ADCC y citotoxicidad natural

15 Las células NK se raspan del cultivo y se recolectan en un tubo cónico de 50 ml. Las células se lavan una vez con RPMI completo y se centrifugan a 1200 rpm durante 10 minutos. Después, las células NK se resuspenden en 5 ml de medio RPMI completo y se cuentan. Antes de realizar el ensayo, el recuento de células NK se normaliza a una relación efector: objetivo de 10:1. Las células NK normalizadas se siembran en placa y se añade 10 µl de anticuerpos antiendoglina quiméricos a los pocillos designados y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras de control incluyen poblaciones de células no tratadas o tratadas con anticuerpo de control.

20 Las células objetivo de interés se recolectan ((células HUVEC), se lavan, se centrifugan a 1200 rpm durante 10 minutos, y se resuspenden en 5 ml de medio RPMI completo. Las células objetivo se lavan nuevamente y se resuspenden en RPMI libre de suero a una concentración final de 1 x 10⁶ células/ml. Después, las células objetivo se marcan con una concentración final de 5 µg/ml de calceína AM durante 1 h a 37 °C, seguido de dos lavados con RPMI completo. Después, las células objetivo se resuspenden y se añaden a los pocillos con células NK. La combinación de células objetivo/células NK se incuban a 37 °C durante 4 horas. Después de la incubación, las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos, y las células se lavan y se resuspenden en DPBS. La fluorescencia se lee mediante el uso de excitación/emisión de 450/530 nm y la emisión es una medida de la muerte celular mediada por los anticuerpos.

30 Ejemplo 9

Dosis para la administración

35 Las dosis óptimas de los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden determinarse mediante el uso de métodos reconocidos en la técnica y como se describió anteriormente.

40 En una modalidad no limitante, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden administrarse a un sujeto en varias cantidades de dosificación y en varios marcos de tiempo. Las dosis no limitantes incluyen aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, o cualquier número entero intermedio. Además, la o las dosis de un anticuerpo pueden administrarse dos veces por semana, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas, cada 4 semanas, cada 6 semanas, cada 8 semanas, cada 12 semanas, o cualquier combinación de semanas de estas. Se contemplan, además, ciclos de dosificación tales como, por ejemplo, administrar anticuerpos una o dos veces por semana durante 4 semanas, seguido de dos semanas sin terapia. Los ciclos de dosificación adicionales que incluyen, por ejemplo, diferentes combinaciones de las dosis y los ciclos semanales descritos en la presente descripción también se contemplan en la presente descripción.

50 En otra modalidad, puede administrarse Bevacizumab (AVASTIN®) en base a las dosis y regímenes siguientes:

Tipo de tumor	Régimen de dosis
Tumores sólidos refractarios	Administración de 2,5, 5, 7,5, 10 o 15 mg/kg por vía intravenosa semanalmente o cada 3 semanas seguido de 7,5 o 15 mg/kg por vía intravenosa semanalmente cada 3 semanas.
Tumores sólidos avanzados	Administración de 5 o 10 mg/kg por vía intravenosa cada 7 o 14 días.
Cáncer colorrectal	Administración de 5 mg/kg por vía intravenosa en el día 1, proporcionada cada 1 o 2 semanas ± 2 días para un total de tres dosis.
	Administración de 5 mg/kg por vía intravenosa en el día 1 cada 1 o 2 semanas por 10 ciclos.
	Administración de 7,5 mg/kg por vía intravenosa en el día 1 cada 1 o

Tipo de tumor	Régimen de dosis
	3 semanas por 6 ciclos.
Cáncer de pulmón	Administración de 15 mg/kg por vía intravenosa en el día 1 cada 1 o 3 semanas por 3 o 6 ciclos.
Cáncer cerebral (gliosarcomas y gliomas)	Administración de 10 mg/kg semanalmente o una semana sí y otra no por 6 ciclos.
	Cuatro (4) ciclos de administración de 10 mg/kg cada 7 o 14 días.
	Administración de 15 mg/kg cada semana o cada 3 semanas.
Cáncer de ovario	Administración de 15 mg/kg por vía intravenosa en el día 1, seguido de administración de 15 mg/kg por vía intravenosa cada 7 o 21 días por 5 ciclos.
Carcinoma neuroendocrino	Administración de 15 mg/kg por vía intravenosa durante 90 minutos cada 7 o 21 días.
Cáncer cervical	Administración de 10 mg/kg por vía intravenosa en los días 1, 7 y 15
Cáncer de mama	Administración de 10 mg/kg por vía intravenosa cada 1 o 2 semanas por 2 o 4 ciclos.
Cáncer de próstata	Administración intravenosa cada semana o cada 3 semanas para un total de 17 ciclos por un total de 1 año.
Cáncer de hígado	Administración de 10 mg/kg por vía intravenosa cada 7 o 14 días, con repetición del ciclo cada 28 días.
Cáncer pancreático	Administración de 10 a 15 mg/kg por vía intravenosa durante 90 minutos cada 1 o 2 semanas.
Cáncer metastásico de cabeza y cuello	Administración de 15 mg/kg por vía intravenosa cada 1 o cada 3 semanas.

Ejemplo 10

Expresión de endoglina (CD105) en tipos de tumores sólidos

5

La expresión de endoglina en tumores sólidos se evaluó mediante el uso de inmunohistoquímica. Muestras de carcinoma humano congeladas y fijadas con acetona se dejaron reaccionar con una dilución de 10.000 veces de ascitis con el anticuerpo antiendoglina SN6j o ascitis con una IgG de control del mismo isotipo y se tiñeron con estuches de tinción DAKO. La tinción de contraste se realizó con hematoxilina. El SN6j se unió a los vasos sanguíneos dentro del tumor, mientras que la IgG de control del mismo isotipo no mostró tinción alguna. Todos los tipos de tumor probados demostraron expresión de endoglina dentro de la vasculatura del tumor.

10

Tumor	Número de especímenes	Reactividad (0,+,++,+++)
Vejiga	2	+++
Hueso	1	+++
Mama	21	+++
Colon	4	+++
Esófago	1	+++
Hígado	1	+++
Pulmón	3	+++
Linfoma	7	+++
Ovario	2	+++/**
Páncreas	1	+++
Pene	1	+++
Recto	2	+++

Tumor	Número de especímenes	Reactividad (0,+,,+,+++)
Estómago	2	+++/>++
Tiroides	3	+++/>++

Ejemplo 11

5 Terapia antiangiogénica de tumores de cáncer de mama humano preformados en piel humana injertada en ratones SCID

El efecto de los anticuerpos descritos en la presente descripción puede evaluarse con respecto a su efecto antiangiogénico en tumores de cáncer de mama humano preformados en piel humana injertada en ratones SCID.

10 Brevemente, células MCF-7 (8×10^6 células en 0,1 ml de PBS) se trasplantan por vía intradérmica en piel humana de grosor completo injertada en ratones SCID si los injertos no muestran signos de inflamación, contracción o rechazo. Los ratones se dejan sin tratamiento hasta la aparición de tumores palpables definidos (3 a 6 mm de diámetro en la mayoría de los casos). Los ratones con tumores definidos se dividen en grupos para los estudios terapéuticos. Soluciones (composiciones) que contienen (1) anticuerpo antiendogлина quimérico, (2) bevacizumab (AVASTIN®), (3) una combinación de un anticuerpo antiendogлина quimérico y bevacizumab (AVASTIN®), o (4) una IgG de control del mismo isotipo se diluyen cada una con PBS estéril que contiene albúmina sérica de ratón (concentración final 0,05 %). Para la terapia con AcM, se administra 200 μ g/0,2 ml de anticuerpo de prueba o IgG de control por vía intravenosa (i.v.) por medio de la vena de la cola de los ratones. La administración se proporciona cada dos a tres días.

20 Durante el tratamiento, los ratones se monitorean diariamente para el tamaño tumoral y la morbilidad. Los ratones se pesan dos veces por semana mediante el uso de una balanza electrónica (OHAUS™ Modelo GT210). El tamaño tumoral se mide tres veces por semana mediante el uso de un calibre electrónico (calibre PRO-MAX de 6 pulgadas; Fowler Co., Newton, Mass.) conectado a un ordenador que usa el programa informático OptoDemo™ (Fowler Co.). Los diámetros tumorales medidos se convierten a volúmenes tumorales mediante el uso de, por ejemplo, la fórmula siguiente: $V = \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura} \times \pi/6$. El análisis estadístico de los datos para la comparación de diferentes grupos de ratones se lleva a cabo mediante el uso de la prueba t de Student.

Ejemplo 12

30 Modelo de ratón para cáncer de ovario

Para determinar la capacidad de un anticuerpo antiendogлина quimérico y un anticuerpo anti-VEGF, o para tratar cáncer de ovario, puede usarse una línea celular de cáncer de ovario en ratones SCID, transgénicos o desnudos.

35 Brevemente, se implantan células de cáncer de ovario en ratones SCID, transgénicos o desnudos para generar tumores de ovario. Los grupos de ratones que portan tumores establecidos se tratan por administración i.v. de dosis escaladas (que comienzan a partir de 1,8 mg/kg de peso corporal) de anticuerpo antiendogлина quimérico, bevacizumab (AVASTIN®), una combinación de un anticuerpo monoclonal (AcM) antiendogлина quimérico y bevacizumab (AVASTIN®), o IgG de control. El tratamiento se realiza 2 o 3 veces por semana. Puede usarse quimioterapia en todos los grupos. Los ratones se monitorean y el crecimiento tumoral se mide 2 o 3 veces por semana.

Ejemplo 13

45 Modelo de ratón para cáncer de riñón

Para determinar la capacidad de un anticuerpo antiendogлина quimérico y un anticuerpo anti-VEGF de tratar cáncer de riñón, se usa una línea celular de cáncer de riñón en ratones SCID, transgénicos o desnudos.

50 Brevemente, se implantan células de cáncer de riñón en ratones SCID, transgénicos o desnudos para generar tumores de riñón. Los grupos de ratones que portan tumores establecidos se tratan por administración i.v. de dosis escaladas (que comienzan a partir de 1,8 mg/kg de peso corporal) de anticuerpo antiendogлина quimérico, bevacizumab (AVASTIN®), una combinación de un anticuerpo monoclonal (AcM) antiendogлина quimérico y bevacizumab (AVASTIN®), o IgG de control. El tratamiento se realiza 2 a 3 veces por semana. Puede usarse quimioterapia en todos los grupos. Los ratones se monitorean y el crecimiento tumoral se mide 2 a 3 veces por semana.

55 Ejemplo 14

Modelo de ratón para cáncer colorrectal

60 Para determinar la capacidad de un anticuerpo antiendogлина quimérico y un anticuerpo anti-VEGF de tratar cáncer colorrectal, se usa una línea celular de cáncer de mama en ratones SCID, transgénicos o desnudos.

5 Brevemente, se implantan células de cáncer de mama en ratones SCID, transgénicos o desnudos para generar tumores colorrectales. Los grupos de ratones que portan tumores establecidos se tratan por administración i.v. de dosis escaladas (que comienzan a 10 mg/kg de peso corporal) de anticuerpo antiendogлина quimérico, bevacizumab (AVASTIN®), o una combinación de un anticuerpo monoclonal (AcM) antiendogлина quimérico y bevacizumab (AVASTIN®). A los animales de control se administra una IgG de control. El tratamiento se realiza 2 o 3 veces por semana. Puede usarse quimioterapia en todos los grupos. Los ratones se monitorean y el crecimiento tumoral se mide 2 a 3 veces por semana.

10 Ejemplo 15

Modelo de ratón para cáncer cerebral

15 Para determinar la capacidad de un anticuerpo antiendogлина quimérico y un anticuerpo anti-VEGF de tratar cáncer cerebral, se usa una línea celular de glioblastoma multiforme en ratones SCID, transgénicos o desnudos.

20 Brevemente, se implantan células cancerosas de glioblastoma multiforme en ratones SCID, transgénicos o desnudos para generar tumores de mama. Los grupos de ratones que portan tumores establecidos se tratan por administración i.v. de dosis escaladas (que comienzan a 10 mg/kg de peso corporal) de anticuerpo antiendogлина quimérico, bevacizumab (AVASTIN®), o una combinación de un anticuerpo monoclonal (AcM) antiendogлина quimérico y bevacizumab (AVASTIN®). A los animales de control se administra una IgG de control. El tratamiento se realiza 2 o 3 veces por semana. Puede usarse quimioterapia en todos los grupos. Los ratones se monitorean y el crecimiento tumoral se mide 2 a 3 veces por semana.

25 Ejemplo 16

Ensayo clínico de terapia de combinación para cáncer colorrectal

30 Este ejemplo describe un estudio aleatorizado, a ciegas, controlado con placebo, multicéntrico, de Fase II o Fase III diseñado para proporcionar una evaluación preliminar de la seguridad y eficacia de la combinación de anticuerpo antiendogлина quimérico con bevacizumab (AVASTIN®) en pacientes con cáncer colorrectal. Se inscribieron alrededor de aproximadamente 100 - aproximadamente 800 pacientes, con asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo de tratamiento y asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo placebo. El ensayo consistirá en la administración de dosis intravenosas repetidas de anticuerpo antiendogлина quimérico a aproximadamente 0,1 - aproximadamente 10 mg/kg o placebo cada una a tres semanas combinado con bevacizumab (AVASTIN®) a aproximadamente 5 mg/kg por vía intravenosa en el día 1 cada 2-3 semanas por 6-10 ciclos. Puede usarse quimioterapia en todos los grupos. El marco de tiempo del estudio se estima en aproximadamente 6 meses - aproximadamente 5 años, con continuación de la terapia para los respondedores como se indica al final del estudio inicial. Las medidas de resultado adicionales son las siguientes:

40 Medida de resultado primaria: tasa de respuesta global. Un objetivo del estudio es demostrar un aumento de la tasa de respuesta global de aproximadamente 40 % con bevacizumab (AVASTIN®) más placebo a aproximadamente 60 % (o más) con bevacizumab (AVASTIN®) más anticuerpo antiendogлина quimérico.

45 Las medidas de resultado secundarias que pueden evaluarse incluyen la duración de la respuesta, el tiempo hasta la progresión del tumor, la supervivencia global, eventos adversos graves y no graves. Por ejemplo, un tratamiento puede prevenir la progresión de la enfermedad (es decir, detención) o puede dar lugar a una mejoría. Alternativamente, o además, pueden medirse otros objetivos con respecto a uno o más de los siguientes: disminución de la carga tumoral, disminución de la neovascularización, reducción de los efectos secundarios, disminución de las reacciones adversas, y/o aumento del cumplimiento del paciente.

50 Ejemplo 17

Ensayo clínico de terapia de combinación para cáncer de riñón

55 Este ejemplo describe un estudio aleatorizado, a ciegas, controlado con placebo, multicéntrico, Fase II o Fase III diseñado para proporcionar una evaluación preliminar de la seguridad y eficacia de la combinación de anticuerpo antiendogлина quimérico con Bevacizumab (AVASTIN®) en pacientes con cáncer de células renales (cáncer de riñón). Se inscribieron alrededor de aproximadamente 100 - aproximadamente 800 pacientes, con asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo de tratamiento y asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo placebo. El ensayo consistirá en la administración de dosis intravenosas repetidas de anticuerpo antiendogлина quimérico a aproximadamente 0,1 - aproximadamente 30 mg/kg o placebo cada una a tres semanas combinado con Bevacizumab (AVASTIN®) a aproximadamente 2,5 - aproximadamente 15 mg/kg cada dos semanas por 3-6 ciclos o hasta la progresión. Puede usarse, además, interferón en ambos brazos de tratamiento. El marco de tiempo del estudio se estima en aproximadamente 6 meses - aproximadamente 5 años, con

continuación de la terapia para los respondedores como se indica al final del estudio inicial. Las medidas de resultado adicionales son las siguientes:

5 Medida de resultado primaria: supervivencia libre de progresión. Un objetivo del estudio es demostrar un aumento de la supervivencia libre de progresión de aproximadamente 9-13 meses en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) más placebo a aproximadamente 14-18 meses (o más) en el brazo Bevacizumab (AVASTIN®) más anticuerpo antiendogлина quimérico.

10 Las medidas de resultado secundarias que pueden evaluarse incluyen la duración de la respuesta, el tiempo hasta la progresión del tumor, la supervivencia global, eventos adversos graves y no graves. Por ejemplo, un tratamiento puede prevenir la progresión de la enfermedad (es decir, detención) o puede dar lugar a una mejoría. Alternativamente, o además, pueden medirse otros objetivos con respecto a uno o más de los siguientes: disminución de la carga tumoral, disminución de la neovascularización, reducción de los efectos secundarios, disminución de las reacciones adversas, y/o aumento del cumplimiento del paciente.

15 Ejemplo 18

Ensayo clínico de terapia de combinación para cáncer hepatocelular

20 Este ejemplo describe un estudio aleatorizado, a ciegas, controlado con placebo, multicéntrico, Fase II o Fase III diseñado para proporcionar una evaluación preliminar de la seguridad y eficacia de la combinación de anticuerpo antiendogлина quimérico con Bevacizumab (AVASTIN®) o sorafenib en pacientes con cáncer hepatocelular (cáncer de hígado). Se inscribieron alrededor de aproximadamente 100 - aproximadamente 800 pacientes, con asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo de tratamiento y asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo placebo. El ensayo consistirá en la administración de dosis intravenosas repetidas de anticuerpo antiendogлина quimérico a aproximadamente 0,1 - aproximadamente 30 mg/kg o placebo cada una a tres semanas combinado con Bevacizumab (AVASTIN®) a aproximadamente 2,5 - aproximadamente 15 mg/kg cada dos a tres semanas o con sorafenib a aproximadamente 400 mg al día por 3-6 ciclos o hasta la progresión. El marco de tiempo del estudio se estima en aproximadamente 6 meses - aproximadamente 5 años, con continuación de la terapia para los respondedores como se indica al final del estudio inicial. Las medidas de resultado adicionales son las siguientes:

35 Medidas de resultado primarias: Supervivencia libre de progresión. Un objetivo del estudio es demostrar un aumento de la supervivencia libre de progresión de aproximadamente 3-9 meses en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) (o sorafenib) más placebo a aproximadamente 6-12 meses (o más) en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) (o sorafenib) más anticuerpo antiendogлина quimérico.

40 Las medidas de resultado secundarias que pueden evaluarse incluyen la duración de la respuesta, el tiempo hasta la progresión del tumor, la supervivencia global, eventos adversos graves y no graves. Por ejemplo, un tratamiento puede prevenir la progresión de la enfermedad (es decir, detención) o puede dar lugar a una mejoría. Alternativamente, o además, pueden medirse otros objetivos con respecto a uno o más de los siguientes: disminución de la carga tumoral, disminución de la neovascularización, reducción de los efectos secundarios, disminución de las reacciones adversas, y/o aumento del cumplimiento del paciente.

45 Ejemplo 19

Ensayo clínico de terapia de combinación para cáncer de ovario

50 Este ejemplo describe un estudio aleatorizado, a ciegas, controlado con placebo, multicéntrico, Fase II o Fase III diseñado para proporcionar una evaluación preliminar de la seguridad y eficacia de la combinación de anticuerpo antiendogлина quimérico con Bevacizumab (AVASTIN®) en pacientes con cáncer de ovario. Se inscribieron alrededor de aproximadamente 100 - aproximadamente 800 pacientes, con asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo de tratamiento y asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo placebo. El ensayo consistirá en la administración de dosis intravenosas repetidas de anticuerpo antiendogлина quimérico a aproximadamente 0,1 - aproximadamente 30 mg/kg o placebo cada una a tres semanas combinado con Bevacizumab (AVASTIN®) a aproximadamente 15 mg/kg por vía intravenosa en el día 1, seguido de administración de 15 mg/kg por vía intravenosa cada 21 días por 5 ciclos. Puede usarse, además, quimioterapia en ambos brazos de tratamiento. El marco de tiempo del estudio se estima en 6 meses - aproximadamente 5 años, con continuación de la terapia para los respondedores como se indica al final del estudio inicial. Las medidas de resultado adicionales son las siguientes:

60 Medidas de resultado primarias: Supervivencia libre de progresión. Un objetivo del estudio es demostrar un aumento de la supervivencia libre de progresión de aproximadamente 3-6 meses en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) más placebo a aproximadamente 4-12 meses (o más) en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) más anticuerpo antiendogлина quimérico. Un objetivo del estudio es demostrar un aumento de la tasa de respuesta global de

aproximadamente 20 % con Bevacizumab (AVASTIN®) más placebo a aproximadamente 30 % (o más) con Bevacizumab (AVASTIN®) más anticuerpo antiendoglina quimérico.

Las medidas de resultado secundarias que pueden evaluarse incluyen la duración de la respuesta, el tiempo hasta la progresión del tumor, la supervivencia global, eventos adversos graves y no graves. Por ejemplo, un tratamiento puede prevenir la progresión de la enfermedad (es decir, detención) o puede dar lugar a una mejoría. Alternativamente, o además, pueden medirse otros objetivos con respecto a uno o más de los siguientes: disminución de la carga tumoral, disminución de la neovascularización, reducción de los efectos secundarios, disminución de las reacciones adversas, y/o aumento del cumplimiento del paciente.

Ejemplo 20

Ensayo clínico de terapia de combinación para glioblastoma multiforme

Este ejemplo describe un estudio aleatorizado, a ciegas, controlado con placebo, multicéntrico, Fase II o Fase III diseñado para proporcionar una evaluación preliminar de la seguridad y eficacia de la combinación de anticuerpo antiendoglina quimérico con Bevacizumab (AVASTIN®) en pacientes con glioblastoma multiforme (cáncer cerebral). Se inscribieron alrededor de aproximadamente 100 - aproximadamente 800 pacientes, con asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo de tratamiento y asignación de aproximadamente 50 - aproximadamente 400 pacientes a un grupo placebo. El ensayo consistirá en la administración de dosis intravenosas repetidas de anticuerpo antiendoglina quimérico a aproximadamente 0,1 - aproximadamente 30 mg/kg o placebo cada una a tres semanas combinado con Bevacizumab (AVASTIN®) a aproximadamente 2,5 - aproximadamente 15 mg/kg cada dos a tres semanas por 3-6 ciclos o hasta la progresión. El marco de tiempo del estudio se estima en aproximadamente 6 meses - aproximadamente 5 años, con continuación de la terapia para los respondedores como se indica al final del estudio inicial. Las medidas de resultado adicionales son las siguientes:

Medidas de resultado primarias: Supervivencia libre de progresión. Un objetivo del estudio es demostrar un aumento de la supervivencia libre de progresión de aproximadamente 3-9 meses en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) más placebo a aproximadamente 4-12 meses (o más) en el brazo de Bevacizumab (AVASTIN®) más anticuerpo antiendoglina quimérico. Las medidas de resultado secundarias que pueden evaluarse incluyen la duración de la respuesta, el tiempo hasta la progresión del tumor, la supervivencia global, eventos adversos graves y no graves. Por ejemplo, un tratamiento puede prevenir la progresión de la enfermedad (es decir, detención) o puede dar lugar a una mejoría. Alternativamente, o además, pueden medirse otros objetivos con respecto a uno o más de los siguientes: disminución de la carga tumoral, disminución de la neovascularización, reducción de los efectos secundarios, disminución de las reacciones adversas, y/o aumento del cumplimiento del paciente

Ejemplo 21

Estudio de toxicología sistémica en monos cynomolgus

Los monos cynomolgus se utilizan en un estudio para abordar la toxicología de anticuerpos antiendoglina quiméricos en combinación con Bevacizumab (AVASTIN®).

Brevemente, los monos reciben dosis semanales durante tres semanas con 10,0 mg/kg, 30,0 mg/kg o 100,0 mg/kg del anticuerpo antiendoglina quimérico y 2,5, 5, 7,5, 10 o 15 mg/kg de Bevacizumab (AVASTIN®). Los animales con placebo reciben dosis en el mismo esquema con una solución apropiada en ausencia de anticuerpo. Las dosis se administran como un bolo intravenoso durante 30 a 60 minutos y al menos seis animales reciben dosis a cada nivel de dosis. La toxicología se evalúa por medio de una o más de las indicaciones siguientes: mediciones del peso corporal, mediciones clínicas fisiológicas básicas, química seriada del suero, evaluaciones hematológicas y evaluaciones histopatológicas.

Ejemplo 22

Estudio de toxicología regional en monos cynomolgus

Se utilizan monos cynomolgus en un estudio para abordar la toxicología de anticuerpos antiendoglina quiméricos en combinación con ranibizumab (LUCENTIS®) cuando se administran por inyección intravítrea.

Brevemente, los monos reciben dosis por inyección intravítrea semanalmente durante seis semanas con 0,25, 1,25 y 2,5 mg de anticuerpo antiendoglina quimérico y 0,5 mg de ranibizumab (LUCENTIS®). Los animales con placebo reciben dosis en el mismo esquema con una solución apropiada en ausencia de anticuerpo. Las dosis se administran como inyecciones intravítreas y al menos seis animales reciben dosis a cada nivel de dosis. La toxicología se evalúa por medio de una o más de las indicaciones siguientes: mediciones del peso corporal, mediciones clínicas fisiológicas básicas, química seriada del suero, evaluaciones hematológicas y evaluaciones histopatológicas.

Ejemplo 23

Formación de redes tubulares

La angiogénesis puede probarse en un modelo in vitro bidimensional de formación tubular.

5 En un ejemplo, se cultivan HUVEC en medio EGM-2 (Clonetics, Walkersville, MD) que contiene suero fetal bovino al 5 % y factores de crecimiento en matraces (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) en una incubadora de CO₂ a 37 °C en condiciones subconfluentes en presencia de anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo antiendoglina quimérico o ambos anticuerpos anti-VEGF y antiendoglina quimérico durante ocho horas. Se incluye un anticuerpo IgG irrelevante como un control independiente. Después, las células HUVEC se tripsinizan suavemente y se inoculan 10.000 a 15.000 células en gel ECMatrix polimerizado (estuche In vitro angiogenesis assay kit, Chemicon). Después de la incubación durante la noche, las células se visualizan bajo un microscopio y se cuenta la cantidad de polígonos cerrados, se mide la longitud de las células endoteliales continuas y se adquieren imágenes. Todas las condiciones experimentales se prueban por triplicado.

15 Ejemplo 24

Ensayos de brote de nuevos vasos

20 La angiogénesis puede probarse en un modelo in vitro tridimensional de brote de nuevos vasos. Las HUVEC se aíslan a partir de cordones umbilicales y se cultivan en M199 complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (GIBCO, Carlsbad, CA) y complemento de cultivo de células endoteliales (ECGS) (BD Biosciences, Bedford, MA) a 3 °C y 5 % de CO₂, los Pases 2 a 4 de HUVEC se usan para todos los experimentos (el Pase 0 es el cultivo primario). Los fibroblastos de pulmón (LF) se cultivan rutinariamente en DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA) complementado con FBS al 10 % a 37 °C y 5 % de CO₂ y se usan entre P10 y P15. Pueden usarse, además, otras líneas de fibroblastos, que pueden adquirirse de la ATCC.

Preparación de las células

30 Las HUVEC y los fibroblastos se expanden en M199/FBS al 10 %/Pen-Strep (1: 100) 1 a 2 días antes de la adhesión a las microesferas. Para las HUVEC, el medio se cambia a EGM-2 (Clonetics, Walkersville, MD) el día antes de la adhesión a las microesferas. Para los fibroblastos, el medio se cambia a EGM-2 el día antes de la incrustación. La adhesión a las microesferas requiere aproximadamente 400 HUVEC por microesfera. Los fibroblastos se usan a 20.000 células por pocillo para una placa de 24 pocillos. Pueden usarse, además, placas de noventa y seis pocillos con cantidades escaladas en consecuencia.

Preparación de microesferas Cytodex 3

40 En el ensayo pueden usarse, por ejemplo, microesferas microportadoras Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Las microesferas secas (0,5 g) se hidratan y se hinchan en 50 ml de PBS (pH = 7,4) durante al menos 3 horas a temperatura ambiente (RT) en un tubo de 50 ml y se colocan en un balancín.

45 Las microesferas se dejan sedimentar (aproximadamente 15 min). El sobrenadante se desecha y las microesferas se lavan durante algunos minutos en PBS fresco (50 ml).

El PBS de lavado se desecha y se reemplaza con PBS fresco:

50 La suspensión de microesferas se coloca en una botella de vidrio siliconizado (por ejemplo, de Windshield Wiper o Signacote). Las microesferas se esterilizan en autoclave durante 15 min a 115 °C y después se almacenan a 4 °C.

Reactivos

55 Solución de fibrinógeno

60 Se prepara una solución de fibrinógeno mediante la disolución de fibrinógeno a 2 mg/ml en DPBS en un baño de agua a 37 °C. Después, la solución se mezcla por inversión del tubo en lugar de agitación por vórtice. El porcentaje de proteína coagulable puede determinarse y ajustarse en consecuencia. Después, la solución se pasa a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizarla.

Aprotinina

65 La aprotinina liofilizada puede reconstituirse a 4 U/ml en agua DI y esterilizarse por filtración. Se preparan alícuotas de 1 ml cada una y se almacenan a -20 °C.

Trombina

La trombina se reconstituye en agua estéril a 50 U/ml. Se preparan alícuotas de 0,5 ml y se almacenan a -20 °C.

5 Revestimiento de las microesferas con HUVEC (Día 1)

10 Las células HUVEC se tripsinizan. Las microesferas se dejan sedimentar (no centrifugar), el sobrenadante se aspira, y las microesferas se lavan brevemente en 1 ml de medio EGM-2 tibio. Las microesferas (2500) se mezclan con 1×10^6 HUVEC en 1,5 ml de medio EGM-2 tibio en un tubo de FACS y se colocan verticalmente en la incubadora. (Esto será suficiente para aproximadamente 10 pocillos; si es necesario debe realizarse un escalado.)

15 La mezcla se incuba durante 4 horas a 37 °C, con inversión y mezclado del tubo cada 20 min. (las microesferas deben parecer bolas de minigolf después de la adhesión de las células lo que indica un revestimiento suficiente para el brote de nuevos vasos.)

Después de 4 horas, las microesferas revestidas se transfieren a un matraz de cultivo de tejidos T25 (Falcon, Bedford, MA) y se incuban durante la noche en 5 ml de medio EGM-2 a 37 °C y 5 % de CO₂.

20 Incrustación de las microesferas revestidas en gel de fibrina (Día 0)

Se prepara una solución de fibrinógeno a 2,0 mg/ml como se describió anteriormente y se añaden 0,15 Unidades/ml de aprotinina a la solución de fibrinógeno.

25 Las microesferas revestidas se transfieren a un tubo cónico de 15 ml y las microesferas se dejan sedimentar.

Las microesferas se resuspenden en 1 ml de medio EGM-2 y se transfieren a un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Las microesferas se lavan tres veces con 1 ml de medio EGM-2, se mezcla lentamente por pipeteo reiterado con una pipeta P1000. Las microesferas se cuentan en un cubreobjetos y se resuspenden en una solución de fibrinógeno a una concentración de 500 microesferas/ml.

30 Se añade trombina (0,625 Unidades/ml) a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. La suspensión de fibrinógeno/microesferas (0,5 ml) se añade a cada pocillo con cambio de la punta de pipeta para cada pocillo.

35 La trombina y el fibrinógeno/microesferas se mezclan por pipeteo reiterado suave aproximadamente cuatro a cinco veces; evitando la creación de burbujas en el gel de fibrina. Las muestras de control se tratan ya sea en ausencia de anticuerpos o con uno o más anticuerpos de control. Las muestras de prueba se tratan con anticuerpos antiendotelina solos, anticuerpos anti-VEGF solos, o una combinación de estos. Pueden probarse múltiples concentraciones de agentes. La solución de fibrinógeno/microesferas se deja coagular durante 5 minutos a temperatura ambiente y después a 37 °C / 5 % de CO₂ durante 15 min. Es importante que la placa no se toque durante los primeros 5 min de coagulación para minimizar la ruptura de la fibrina, que puede dar lugar a la reducción del brote de nuevos vasos.

45 Se añade EGM-2 (1 ml) a cada pocillo en forma de gotas. Los fibroblastos de pulmón se siembran en la parte superior del coágulo a una concentración de 20.000 células/pocillo. El medio de cultivo se reemplaza con medio EGM-2 fresco un día sí y otro no hasta lograr el crecimiento deseado.

50 Cuando el gel de fibrina se forma, pueden estar presentes pequeñas burbujas en el gel; estas desaparecerán en 3 a 4 días. El brote de nuevos vasos debe ser evidente entre el día 2 y 4. La formación de lumen comienza alrededor del día 4 a 5 y los brotes continúan alargándose. Los tubos recién formados comienzan a ramificarse alrededor del día 4 a 6. En el día 6 a 7, las estructuras similares a microvasos comienzan a anastomosarse con tubos contiguos; el aumento del número de microesferas por pocillo da lugar a una anastomosis más temprana.

El TRC105 quimérico inhibió el brote de nuevos vasos inducido por VEGF en una manera dependiente de la dosis (N=3) mediante el uso de esferoides de HUVEC sembrados en colágeno como se ilustra en la Figura 3.

55 Además, si bien el TRC105 quimérico bloqueó el brote de nuevos vasos inducido por VEGF (rayas diagonales), no inhibe el brote de nuevos vasos inducido por bFGF (relleno de rombos) de esferoides de HUVEC (N=2) como se demuestra en la Figura 4.

60 El efecto inhibitor del TRC105 quimérico sobre el brote de nuevos vasos inducido por VEGF (rayas diagonales), aumentó cuando se combinó con el inhibidor de VEGF AVASTIN® (relleno de rombos) como se ilustra en la Figura 5.

La Figura 6 ilustra que el efecto inhibitor del TRC105 quimérico sobre el brote de nuevos vasos inducido por VEGF (rayas diagonales), no aumentó cuando se combinó con el inhibidor de quinasa PTK787 (relleno de rombos).

65 Ejemplo 25

Inmunocitoquímica de brotes angiogénicos *in vitro*

5 Para la tinción de los núcleos de células endoteliales (EC), los geles de fibrina se lavan dos veces con PBS 1 X y después se fijan durante la noche en paraformaldehído al 2 %. Después de dos lavados más con PBS 1 X, los geles se tiñen con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO).

10 Para la inmunotinción, los LF se eliminan primero a través de un tratamiento breve de los geles con tripsina 10X. La digestión se detiene con suero enseguida que todos los fibroblastos se eliminan. Después, los geles se lavan exhaustivamente con HBSS, 1X (Cellgro, Herndon, VA). Después, los cultivos se fijan durante 10 minutos en formalina al 10 % y se permeabilizan con Tritón X-100 al 0,5 % durante 5 minutos. La unión no específica se bloquea con una solución de BSA al 5 % en PBS durante 2 horas.

15 Los anticuerpos primarios se usan a una dilución 1/100 en amortiguador de bloqueo y se incuban durante la noche a 4 °C. Después de lavar exhaustivamente, el anticuerpo unido se detecta mediante anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488 o conjugados a Alexa Fluor 568 específicos de especie a una dilución 1/1000 (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Se usan anticuerpos específicos de isotipo sin capacidad de unión como control. Si se produce una señal de fondo alta, la concentración de anticuerpo primario o secundario puede reducirse y, si es necesario, los tiempos de incubación y/o lavado pueden aumentarse. La F-actina se tiñe con TRITC-faloidina (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 0,2 µM.

20 Las imágenes de contraste de fases y fluorescentes se capturan en un microscopio IX70 Olympus acoplado con una cámara digital. Los paquetes de imágenes fluorescentes de la serie Z se capturan en un microscopio bifotónico Carl Zeiss MicroImaging LSM 510 Meta y se compilan en versiones tridimensionales con el programa informático Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown PA). Por lo tanto, la expresión de varios marcadores puede detectarse fácilmente.

25 Los paquetes de imágenes ópticas fluorescentes a lo largo del eje z de los cultivos pueden capturarse para crear representaciones en 3D de los vasos. Los núcleos se tiñen con DAPI (verde), y las paredes de los vasos se tiñen con vimentina (naranja). Los lúmenes anchos, huecos son claramente visibles, rodeados por una sola capa de células endoteliales. Estas imágenes confirman que los lúmenes presentes en el ensayo *in vitro* son hendiduras intercelulares y no intracelulares como se observa frecuentemente en los ensayos con Matrigel. Además, puede confirmarse que las HUVEC se encuentran polarizadas, ya que tienen una membrana apical, orientada hacia el lumen, y una membrana basal, opuesta a una membrana basal rica en colágeno IV y el gel de fibrina.

Ejemplo 26

35 Supresión de la neovascularización coroidal

40 Aunque los animales no desarrollan degeneración macular relacionada con la edad (AMD) de por sí, puede producirse neovascularización coroidal semejante a la observada en AMD mediante el uso de un láser para producir roturas focales en la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario retinal (RPE) que la recubre. Esta lesión estimula el crecimiento anormal de los capilares coroidales subyacentes hacia la capa de RPE y el espacio subretinal. La rotura de la membrana de Bruch es común para todas las formas de neovascularización coroidal (CNV), que incluyen la que caracteriza la forma húmeda de AMD.

45 En el modelo de neovascularización coroidal inducida por láser, los grupos de 9 o 10 ratones se tratan con inyecciones subcutáneas (sc) de (1) anticuerpo antiendoglina quimérico solo, (2) anticuerpo anti-VEG solo, (3) anticuerpo antiendoglina quimérico en combinación con anticuerpo anti-VEGF en la misma composición o en composiciones diferentes o (4) anticuerpo de control un día antes de la lesión con láser y en los días 2, 5, 8, y 11 después del láser. A los 14 días después de la lesión con láser, los ratones se inyectan por vía intravenosa con dextrano etiquetado con fluoresceína (50 mg), se sacrifican, y los ojos se disecan rápidamente para preparar montajes coroidales planos o se congelan en compuesto de incrustación de temperatura de corte óptima y se cortan en secciones para la evaluación de las lesiones.

Ejemplo 27

55 El efecto de las composiciones descritas en la presente descripción sobre la neovascularización coroidal inducida por láser se evalúa, además, en monos *cynomolgus* adultos.

60 En este experimento, se administra (1) anticuerpo antiendoglina quimérico solo, (2) anticuerpo anti-VEGF solo, (3) anticuerpo antiendoglina quimérico en combinación con anticuerpo anti-VEGF en la misma composición o en composiciones diferentes o (4) anticuerpo de control por inyección intravenosa o intravítrea. Cada animal recibe nueve o diez quemaduras de láser en cada retina, y el desarrollo de lesiones neovasculares coroidales activas se evalúa por angiografía con fluoresceína, una vez antes de iniciar el tratamiento y 15, 20 y 29 días después del tratamiento con láser. Las composiciones se administran por vía intravenosa una vez a la semana, con inicio una semana antes de la lesión con láser. Las inyecciones intravítreas se realizan cada dos semanas con inicio una semana antes del láser, o una vez, dos semanas después del láser, tiempo en el cual las lesiones de CNV activas ya se han formado. Los

animales de control reciben inyecciones intravenosas semanales o intravítreas cada dos semanas de placebo, con inicio una semana antes del láser.

5 Las lesiones de CNV se visualizan por angiografía con fluoresceína y se califican de acuerdo con procedimientos estándar.

Ejemplo 28

Tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad

10

Primer estudio

15 Los pacientes que manifiestan degeneración macular relacionada con la edad se tratan con una inyección intravítrea de (1) anticuerpo antiendoglina quimérico solo, (2) ranibizumab solo, (3) anticuerpo antiendoglina quimérico en combinación con ranibizumab en la misma composición o en composiciones diferentes o (4) anticuerpo de control para reducir o prevenir el desarrollo de neovascularización, enfermedad macular, y daño retinal.

20 Como primera etapa del tratamiento, los pacientes deben recibir un examen oftálmico completo para establecer una línea de base de salud ocular. El examen oftálmico incluye oftalmoscopia indirecta, biomicroscopia con lámpara de hendidura, examen retinal periférico, mediciones de presión intraocular, agudeza visual (sin ayuda y corrección óptima) sintomatología, fotografía de fondo, angiografía con fluoresceína, tomografía de coherencia óptica, electrorretinografía y mediciones de exploración A.

25 Después del examen preliminar, se administra una inyección intravítrea como se describió anteriormente al ojo afectado de un paciente que manifiesta AMD. Si ambos ojos se encuentran afectados, estos pueden tratarse de manera independiente. El ojo a tratar se inyecta con una solución oftálmica.

30 Después del tratamiento, los ojos del pacientes deben examinarse en los días uno (1), dos (2), siete (7), quince (15), treinta (30) y sesenta (60) y cada mes en lo adelante durante 2 años. Debido a la posibilidad de reaparición, los pacientes deben regresar para exámenes periódicos cada mes en lo adelante. En cada día de examen el paciente se monitorea para detectar la licuación vítrea. Además, los pacientes se monitorean para detectar desprendimientos vítreos posteriores mediante el uso de oftalmoscopia indirecta con depresión de la esclerótica. Por último, la extensión de la AMD presentada por los pacientes se monitorea continuamente a través de exámenes periódicos de la retina, tomografía de coherencia óptica y angiogramas con fluoresceína para monitorear la presencia de fluido subretinal, sangre, exudados, desprendimiento de RPE, cambios retinales quísticos, o la presencia de membrana neovascular subretinal verde grisácea. Pueden requerirse tratamientos adicionales si se observan indicios de reaparición de neovascularización. Los tratamientos adicionales pueden proporcionarse semanalmente o mensualmente. En una modalidad preferida, un tratamiento inicial va seguido de tratamientos posteriores entre 1-6 meses de separación.

40 Segundo estudio

Propósito: Demostrar la eficacia de anticuerpos antiendoglina quiméricos intravítreos y ranibizumab para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular.

45 Métodos: Cincuenta a 500 pacientes (50 a 500 ojos) con neovascularización coroidal subfoveal (CNV) como resultado de AMD participarán en el estudio en un sitio aprobado.

50 Los criterios para la reinyección son presencia de fluido en la mácula, aumento del grosor central de la retina (CRT) de al menos 100 micras, pérdida de al menos 5 letras de visión asociada con aumento de fluido en la mácula, nueva CNV clásica, o nueva hemorragia macular. La medida de resultado principal es la proporción de ojos que pierden menos de 15 letras de visión después de 12 meses. La medición de la agudeza visual con corrección óptima y el examen ocular clínico se realizan a 1 semana, 1 mes y después mensualmente durante 5-12 meses.

55 La agudeza visual promedio y el CRT promedio se miden en comparación con la línea de base. Se anotan los efectos secundarios oculares y/o sistémicos.

Ejemplo 29

Inhibición de la neovascularización de la córnea inducida por lesión

60

65 La neovascularización de la córnea se induce en ratones C57BL/6 machos mediante la colocación intraestromal de 3 suturas de nailon, o por lesión química (NaOH) y desbridamiento mecánico del epitelio corneal. Se realizan múltiples experimentos en los que se administra (1) anticuerpo antiendoglina quimérico solo, (2) anticuerpo anti-VEGF solo, (3) anticuerpo antiendoglina quimérico en combinación con anticuerpo anti-VEGF solo en la misma composición o en composiciones diferentes o (4) anticuerpo de control por vía intraperitoneal una vez o en múltiples puntos de tiempo inmediatamente antes o después de la lesión.

5 El crecimiento de nuevos vasos en la córnea se evalúa por microscopía con lámpara de hendidura y evaluación histológica. La vasculatura se etiqueta con una lectina específica de células endoteliales conjugada a fluoresceína, y la neovascularización se evalúa en montajes corneales planos, así como en secciones transversales mediante el uso de inmunohistoquímica PECAM. La presencia de edema corneal se evalúa, mediante el uso de microscopía con lámpara de hendidura, y el grosor de la córnea se mide en secciones transversales; los aumentos del grosor de la córnea reflejan la cantidad de edema. Las cantidades de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos se determinan mediante la tinción de secciones transversales con HEMA-3 o anticuerpo monoclonal F4/80 de rata antirratón, respectivamente.

Listado de secuencias

Sec. con núm. de ident.: 1 (VL de TRC105: las CDR están subrayadas)

5 QIVLSQSPAILSASPGKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTIS
RVEAEDAATYYCCQWSSNPLTFGAGTKLELK

Sec. con núm. de ident.: 2 (CL de TRC105)

10 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sec. con núm. de ident.: 3 (VH de TRC105: las CDR están subrayadas)

15 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKASNHATYYAESVKGRFTISRD
DSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTRWRREFDSWGQGTTLTVSS

Sec. con núm. de ident.: 4 (Cy1 de TRC105)

20 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 5 (cadena pesada variable de A.4.6.1: Ac monoclonal murino que se une específicamente a VEGF)

25 EIQLVQSGPELKQPGETVRISCKASGYFTFNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLETS
ASTAYLQISNLKNDTATYFCAKYPHYGSSHWYFDVWGAGTTVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 6 (cadena pesada variable de F(ab) humanizado: F(ab)-12)

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTTLTVSS

Sec. con núm. de ident.: 7 (cadena pesada variable de humIII: marco consenso humano para el subgrupo pesado III)

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGGSTYYADSVKGRFTI SRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFDYWGQGTTLTVSS

Sec. con núm. de ident.: 8 (cadena ligera variable de A.4.6.1: Ac monoclonal murino que se une específicamente a VEGF)

35 DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI
SNLEPEDIATYYCCQYSTVPWTFGGGTKLEIKR

Sec. con núm. de ident.: 9 (cadena ligera variable de F(ab) humanizado: F(ab)-12)

40 DIQMTQSPSSLSASVDRVITITSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCCQYSTVPWTFGQGTKVEIKR

Sec. con núm. de ident.: 10 (cadena ligera variable de humkl: marco consenso humano para el subgrupo kappa I)

DIQMTQSPSSLSASVDRVITITCRASQDISNYLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCCQYNSLPWTFGQGTKVEIKR

45 Sec. con núm. de ident.: 11 (Cy1 humano)

ES 2 657 497 T3

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

Reivindicaciones

1. Un método para inhibir el brote de nuevos vasos inducido por VEGF mediante el contacto de células in vitro con una composición que comprende un anticuerpo antiendoglina quimérico y una composición que comprende un anticuerpo anti-VEGF antagonista; dicho anticuerpo antiendoglina quimérico comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 1; una región constante de cadena ligera (C_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 2; una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 3; y una región constante (F_c) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 4.
2. Una composición que comprende un anticuerpo antiendoglina quimérico y una composición que comprende un anticuerpo anti-VEGF antagonista para el uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto; dicho anticuerpo antiendoglina quimérico comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 1; una región constante de cadena ligera (C_L) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 2; una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 3; y una región constante (F_c) que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone como la sec. con núm. de ident.: 4; en donde el tratamiento en dicha enfermedad relacionada con la angiogénesis se caracteriza por la inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición comprende, además, un portador o excipiente aceptable.
4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad relacionada con la angiogénesis es un cáncer, o una metástasis de este.
5. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición inhibe el crecimiento canceroso.
6. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el cáncer es un tumor sólido, preferentemente, en donde el cáncer es un tumor de base epitelial.
7. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cáncer se selecciona de un cáncer de pulmón, una enfermedad maligna ginecológica, un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un cáncer de ovario, un cáncer uterino, un cáncer colorrectal, un cáncer de próstata, un cáncer de cabeza, un cáncer de hígado (cáncer hepatocelular), un cáncer de cuello, un cáncer de riñón (cáncer de células renales), un sarcoma, un mieloma, y un linfoma.
8. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad relacionada con la angiogénesis es una enfermedad ocular caracterizada por angiogénesis/neovascularización.
9. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad ocular es degeneración macular o retinopatía diabética.
10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la degeneración macular es degeneración macular relacionada con la edad (AMD).
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo antiendoglina quimérico está presente en la composición en una cantidad de 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 30 mg/kg.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-VEGF está presente en la composición en una cantidad de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo antiendoglina quimérico y el anticuerpo anti-VEGF se administran secuencialmente o simultáneamente.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo antiendoglina quimérico y el anticuerpo anti-VEGF se administran en el mismo sitio, o se administran en sitios diferentes.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab.

Figura 1

Modelo de regulación de la angiogénesis por CD105 (Endogлина)

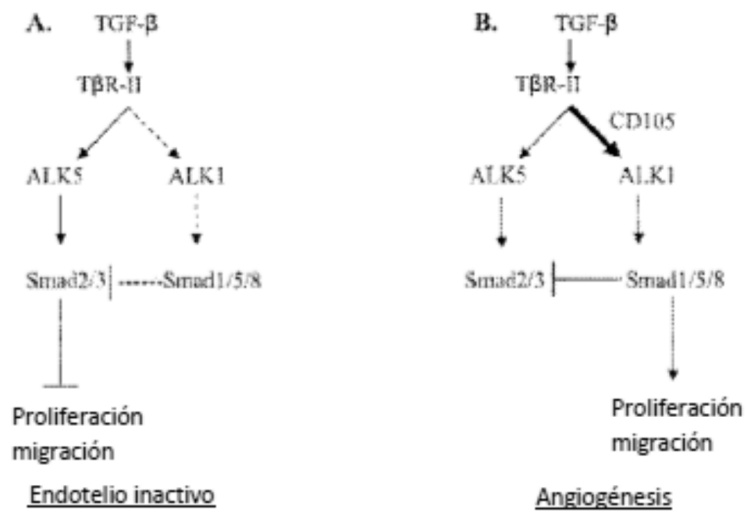


Figura 2

- A. V_H de TRC105: las CDR están subrayadas**
 QIVLSQSRAILLSASPGEKVMTTCRASSSYVYHNYQOKPQSSPKRPIYNTSMLASGVPRFSGSGSGTYSIIFISRVFAEDAATYYCQQWSNRPIT
 FQAGTELEIK (sec. con núm. de ident.: 1)
- B. C_L de TRC105:**
 TVAAPSVFIFPPSDEQMKSGTASVYVCLINNYPREAKVQWKNDAIQSGNQSQESVTEQDSKDSVYSLSTLTISRADYERHKKVADEVTRQGISSP
 VTKSFRRGEC (sec. con núm. de ident.: 2)
- C. V_H de TRC105: las CDR están subrayadas**
 EVKLEESGGGLVQPGGSKKISCAASGSPSDAANDVNRQSPPEKGEFMTVAEIRSRASNNHYTYAESVKGKRFITSRDSDKSSVYLQMNSLPAEDTGIY
 YCTRRRRFPDSWGQGTLLTVSS (sec. con núm. de ident.: 3)
- D. C_{Y1} de TRC105**
 ASYKGGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVITDYFPEPEVTVSNNSGALTSQVHTEPAAVLQSSGLYSLSVYTVPSISLGTQYICNVNHRKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKTHHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVYYFNMYVDGVEVHNAKTKPREDOYNSTYRVVSVLTVL
 HQDMLNREKREYCKVSNRALLPAPIERTIKAAKGQPREPQVYTLPPSRDELTRNQVSLTCLVYKGFYPSDIAVEWESNGQFENNYKTTTPVLDSDGSFR
 LYSKLTITVTKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 4)

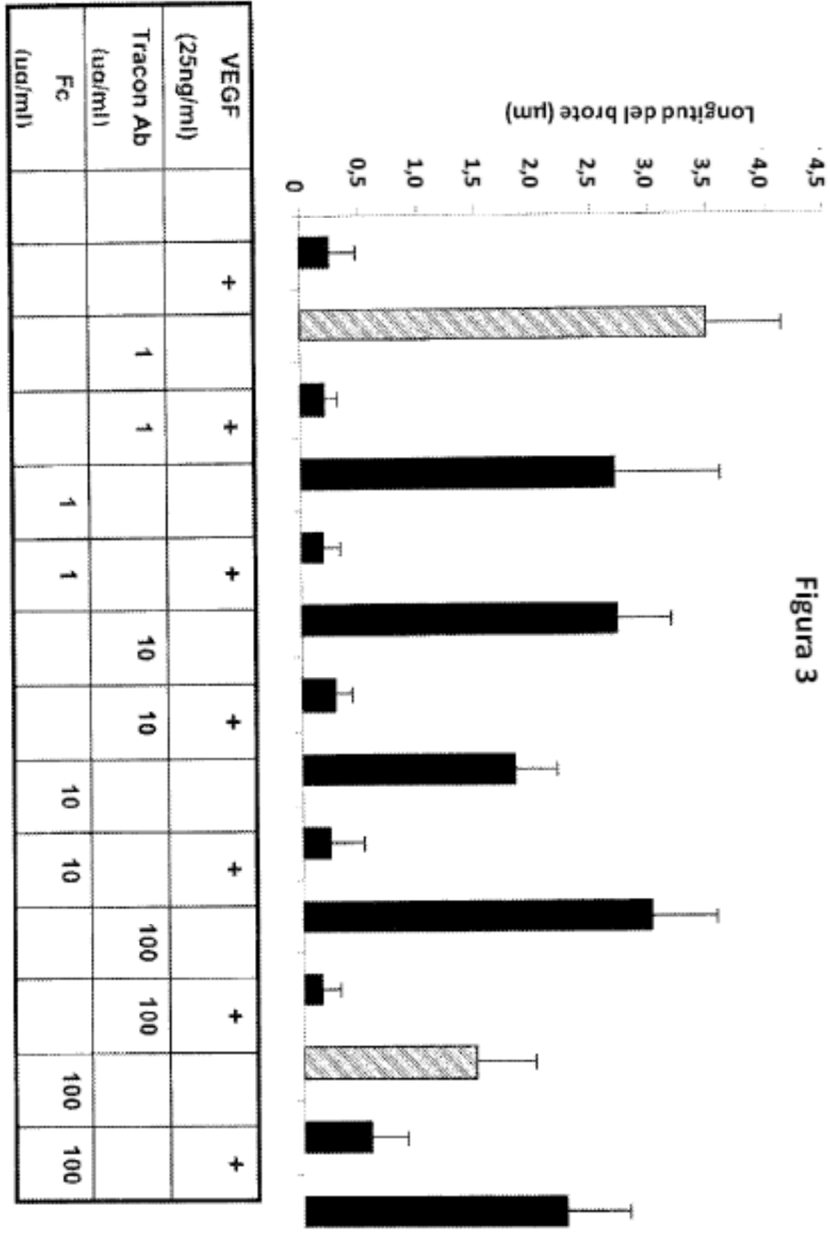
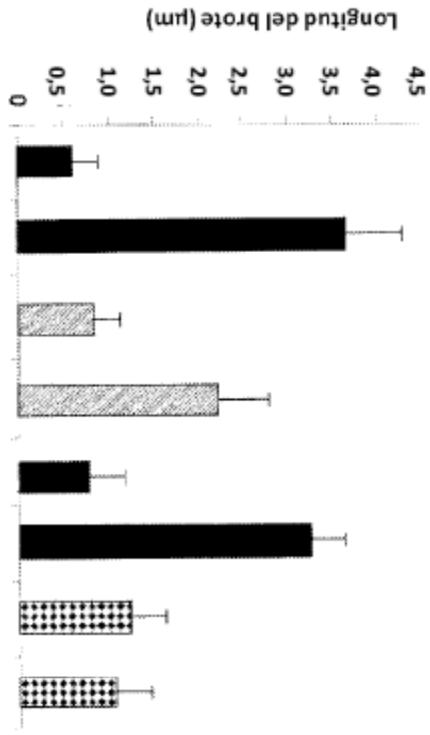
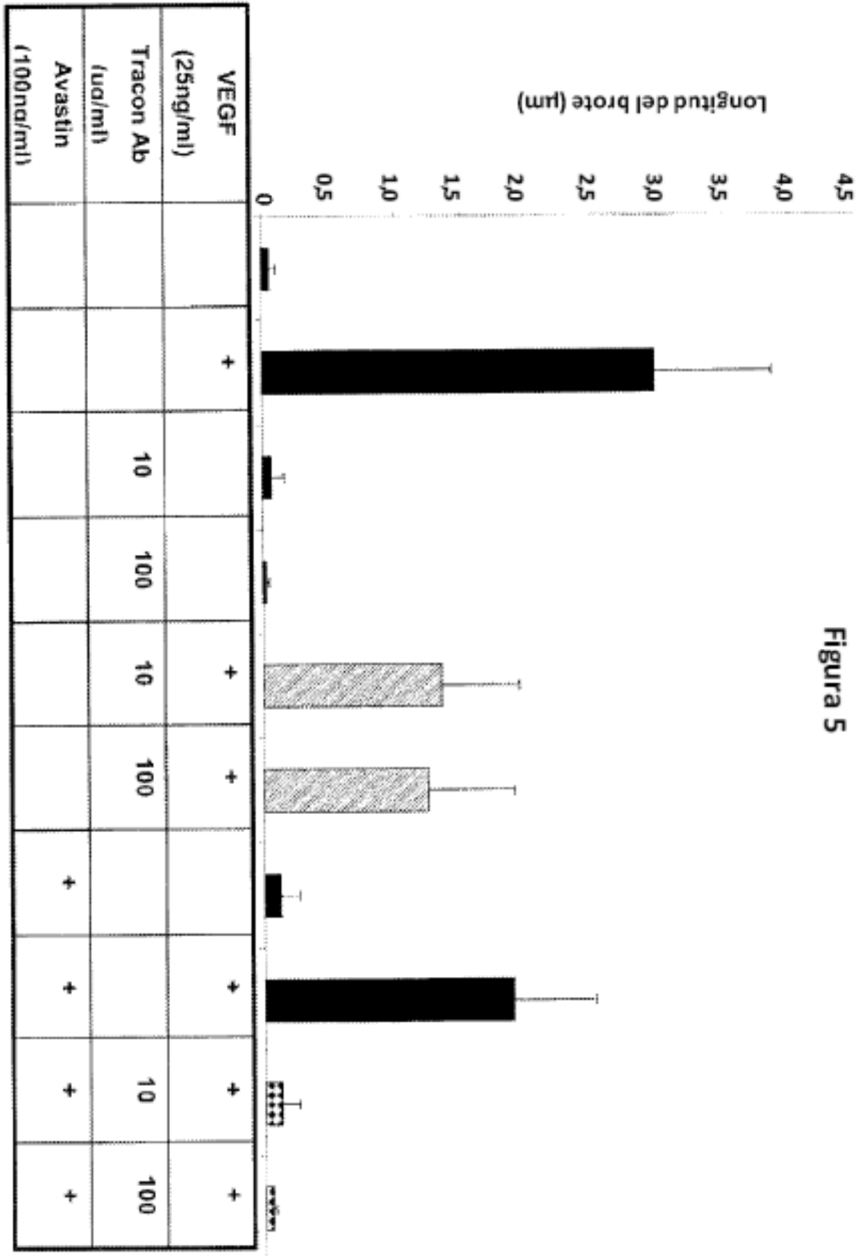


Figura 4



VEGF (25ng/ml)		+		+		+	
Tracoon Ab (10ua/ml)			10	10			10
FC (10ua/ml)					10	10	
BFGF (100na/ml)						+	+



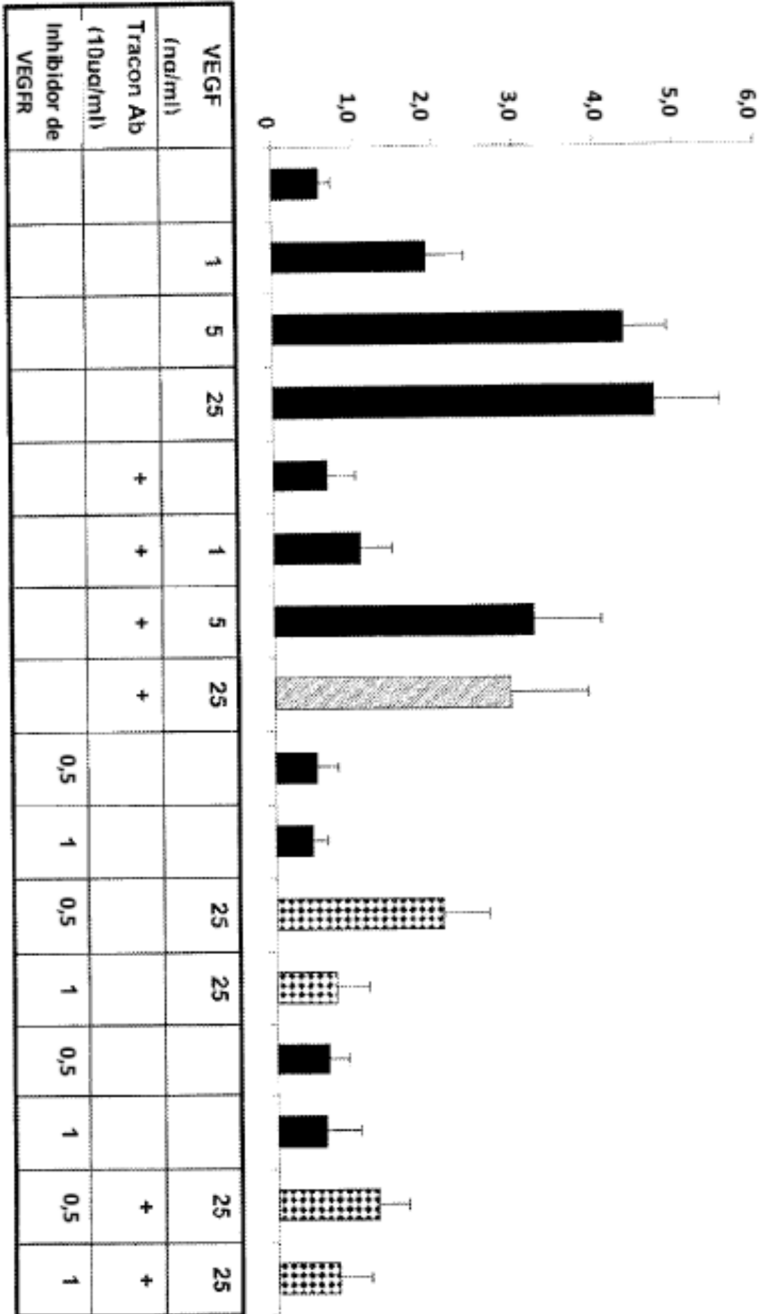


Figura 6