

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 406**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2014 PCT/US2014/013402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14117160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2014 E 14704040 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2948476**

54 Título: **Anticuerpos anti-Flt-1 en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

28.01.2013 US 201361757571 P

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

19.07.2018

73 Titular/es:

**SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.
(50.0%)**

300 Shire Way

Lexington, MA 02421, US y

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

JOSIAH, SERENE;

LUBY, THOMAS M.;

ASAKURA, ATSUSHI;

KEEFE, DENNIS;

CHARNAS, LAWRENCE y

VERMA, MAYANK

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 676 406 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).

Anticuerpos anti-Flt-1 en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne**Descripción****5 ANTECEDENTES**

[0001] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una forma recesiva de distrofia muscular ligada a X, que afecta a aproximadamente 1 de cada 3.600 niños, lo que da como resultado la degeneración muscular y la muerte eventual. El trastorno es causado por una mutación en el gen de la distrofina, ubicado en el cromosoma X humano, que codifica la proteína distrofina, un componente estructural importante dentro del tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al complejo de distroglicano (DGC) de la membrana celular. La distrofina une la red de filamentos de actina citoplásmica interna y la matriz extracelular, proporcionando fuerza física a las fibras musculares. En consecuencia, la alteración o la ausencia de distrofina da como resultado una función anormal de la membrana del sarcolema. Si bien ambos sexos pueden portar la mutación, las mujeres rara vez exhiben características clínicas típicas de la enfermedad observada en los niños.

[0002] Actualmente, no existe una cura conocida para la DMD. Se han investigado varias posibilidades terapéuticas que incluyen terapia génica y administración de corticosteroides. Si bien algunos de estos tratamientos pueden retrasar ciertos síntomas, actualmente no existe una opción terapéutica satisfactoria para los pacientes con DMD. Tanto Wu et al. como el documento WO₂006/055809 describen anticuerpos neutralizantes contra Flt-1 humana para el tratamiento de cáncer. Verma et al. describen una histología muscular mejorada en ratones mdx con haploinsuficiencia de Flt-1, mientras que Messina et al. divulgan que la sobreexpresión de VEGF tiene un efecto beneficioso en ratones mdx. Los ratones knock-out mdx son un modelo para DMD.

25 SUMARIO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención proporciona, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en el que el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibe unión de VEGF al receptor Flt-1, También se describen métodos y composiciones mejoradas para tratar la distrofia muscular, en particular, la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y/o la Distrofia Muscular Becker basada en la terapia con anticuerpos anti-Flt-1, Como se describe en los Ejemplos a continuación, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los anticuerpos anti-Flt-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden inhibir que VEGF y otros ligandos se unan al receptor Flt-1, aumentando así la cantidad de VEGF y/u otros ligandos disponibles para unirse a los receptores de VEGF. Mejoras estructurales y funcionales en los síntomas de DMD mejoran. De hecho, como se muestra en los Ejemplos, los presentes inventores han demostrado que la administración de un anticuerpo anti-Flt-1 mejora las medidas de la patología muscular así como la función muscular en un modelo animal de DMD. Por lo tanto, la presente invención proporciona agentes terapéuticos seguros y eficaces basados en anticuerpos para el tratamiento de la DMD.

[0004] En este documento se divulgan métodos para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD) que comprenden administrar a un individuo que padece o es susceptible a la DMD una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de forma que al menos un síntoma o característica de DMD se reduce en intensidad, gravedad o frecuencia, o tiene un inicio retrasado.

[0005] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra parenteralmente. En algunas realizaciones, la administración parenteral se selecciona de administración intravenosa, intradérmica, intratecal, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea y/o transmucosa.

[0006] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra a uno o más tejidos diana seleccionados de músculo estriado (por ejemplo, músculo esquelético, músculo cardíaco). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra al corazón. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra al músculo esquelético. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra a uno o más músculos esqueléticos seleccionados de la Tabla 1. En algunas realizaciones, el músculo estriado (por ejemplo, músculo esquelético) se selecciona del grupo que consiste en tríceps, tibial anterior, sóleo, gastrocnemio, bíceps, trapecio, deltoides, cuádriceps y diafragma.

[0007] En algunas realizaciones, el músculo estriado se selecciona del grupo que consiste de tríceps, tibialis anterior, sóleo, gastrocnemio, bíceps, trapecio, deltoides, cuádriceps, y el diafragma.

[0008] En algunas formas de realización un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra cada dos meses, mensual, cada tres semanas, quincenalmente, semanalmente, diariamente, o a intervalos variables.

[0009] En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno

del mismo, resulta en la regeneración muscular, reducción de la fibrosis, el aumento de la fuerza muscular, aumento de la estabilidad, mayor flexibilidad, mayor rango de movimiento, resistencia aumentada, fatigabilidad reducida, aumento del flujo sanguíneo, mejora de la cognición, mejora de la función pulmonar e/o inhibición de la inflamación.

5 **[0010]** En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión del mismo antígeno reduce la intensidad, severidad o frecuencia, o retrasa la aparición de al menos un síntoma DMD. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo reduce la intensidad, gravedad o frecuencia, o retrasa la aparición de al menos un síntoma de DMD seleccionado del grupo que consiste en pérdida muscular, debilidad muscular, fragilidad muscular, hipertrofia muscular, pseudohipertrofia muscular, contractura articular, deformación esquelética, cardiomiopatía, capacidad para tragar alterada, funcionamiento alterado del intestino y de la vejiga, isquemia muscular, deterioro cognitivo, disfunción conductual, deterioro de la socialización, escoliosis y función respiratoria deteriorada.

15 **[0011]** La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se caracterizan por una capacidad para inhibir la unión de VEGF al receptor Flt-1 para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

20 **[0012]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por una capacidad de unirse a Flt-1 humano con una afinidad mayor que 10^{-9} M, mayor que 10^{-10} M, mayor que $0,5 \times 10^{-10}$ M, mayor que 10^{-11} M, mayor que $0,5 \times 10^{-11}$ M, mayor que 10^{-12} M, o mayor que $0,5 \times 10^{-12}$ M, en un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial (p. ej. BIACORE).

25 **[0013]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza con una CI_{50} por debajo de 100 pM, por debajo de 10 pM, o inferior a 1 pM en un ensayo de competición con Flt-1 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza con una CI_{50} inferior a 100 pM, inferior a 10 pM, o inferior a 1 pM para la inhibición de la unión de VEGF a Flt-1 humana en un ensayo de competición. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, se caracteriza con una CI_{50} inferior a 100 pM, inferior a 10 pM, o inferior a 1 pM para la inhibición de la unión de PlGF a Flt-1 humana en un ensayo de competición.

30 **[0014]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, no se une a VEGFR² (Flk-1) y/o VEGFR³ (Flt-4).

35 **[0015]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a un Flt-1 de ratón o mono. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, no se une a un Flt-1 de ratón o de mono.

40 **[0016]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste en IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, ScFvs, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

45 **[0017]** En algunas formas de realización un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión del mismo antígeno, es IgG. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es IgG1.

50 **[0018]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monoclonal, y en ciertas realizaciones es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humanizado contiene una región Fc humana. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más mutaciones que potencian la afinidad de unión entre la región Fc y el receptor FcRn de manera que se prolonga la semivida *in vivo* del anticuerpo. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 y/o Asn 434 de IgG1 humana..

[0019] Se divulga aquí una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 **[0020]** Como se usa en esta solicitud, los términos "sobre" y "aproximadamente" se utilizan como equivalentes. Cualquier número utilizado en esta solicitud con o sin aproximadamente pretende cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto habitual en la técnica relevante.

60 **[0021]** Otras características, objetos, y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada que sigue. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se proporciona a modo de ilustración solamente, no de limitación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 **[0022]**

FIG. 1 muestra ejemplos de resultados que ilustran el título de antisuero de Flt-1 humana anti-soluble de ratones inmunizados con antígeno de Flt-1 humano soluble. El título de suero anti-sFlt-1 se representa a partir de cinco ratones Balb/c separados 20 días después de la administración.

FIG. 2 muestra ejemplos de resultados que ilustran la unión competitiva de anticuerpos monoclonales con Flt-1 soluble en humanos en un ELISA. Se describe un ELISA de competición de sobrenadantes de hibridoma para la unión de VEGF en Flt-1 humana. El control negativo (IgG de ratón policlonal purificado) no muestra ninguna competencia en Flt-1 humano, mientras que el producto de fusión 01A04 y el anticuerpo comercial de control positivo Abcam56300 son aglutinantes competitivos.

FIG. 3 muestra un anticuerpo monoclonal ejemplar que se une a Flt-1 humana soluble. Se describe ELISA de unión directa de IgG purificada a partir de clones 01A04-02B10 de clones de hibridoma frente a antígeno sFlt-1 humano. En base a las lecturas de absorbancia y la morfología microscópica, se eligió el sub-clon 01A0-02-0210-02G07 para ampliarlo y caracterizarlo más.

FIG. 4 muestra ejemplos de resultados que ilustran la unión del anticuerpo monoclonal a Flt-1 humana soluble mediante ensayo de resonancia de plasmón superficial (BIACORE). Senogramas de resonancia de plasmón superficial para el clon de hibridoma 01A04 (subclon 02B10-02G07) Se describe la unión de IgG al antígeno sFlt-1 humano inmovilizado.

FIG. 5 muestra ejemplos de resultados que ilustran la reactividad cruzada de la unión del anticuerpo monoclonal con Flt-1 de cino (mono). La unión de la IgG purificada del clon 01A04 de hibridoma (subclon 02B10-02G07) a líneas celulares que sobreexpresan Flt-1 humana y cinomolgus es representado. El histograma más oscuro representa un anticuerpo de control de isotipo. El histograma más claro representa el anticuerpo monoclonal 01A04-02B10-02G7.

FIG. 6 muestra ejemplos de resultados que ilustran la unión competitiva de anticuerpos monoclonales con Flt-1 soluble en humanos en un ELISA. Se representa VEGF:sFlt-1 determinación CI_{50} de anticuerpo monoclonal 01A04 (sub-clon 02B10-02G07) frente a un punto de referencia comercial. Los valores se obtuvieron realizando ELISA de competición de las IgG respectivas para la unión de VEGF en Flt-1 humana. El control negativo (IgG de ratón policlonal purificado) no muestra ninguna competencia en Flt-1 humano, mientras que el anticuerpo monoclonal 01A04 y el anticuerpo comercial anti-sFlt-1 de Abeam (número de catálogo 56300) compiten por el sitio de unión de VEGF. El anticuerpo monoclonal 01A04 es un antagonista más potente que el punto de referencia comercial. El CI_{50} para 01A04 era 2,3 pM. El CI_{50} para Abcam 56300 fue de 65 pM.

FIG. 7 muestra ejemplos de resultados que ilustran la inhibición del anticuerpo monoclonal anti-Flt-1 de la unión de VEGF a sFlt-1 en un ensayo basado en células. Las HUVEC primarias se trataron con VEGF humano recombinante (100 ng/ml, 2,4 nM) en presencia o ausencia de Flt-1 soluble humana recombinante (equivalente molar 15X, 36 nM) y anticuerpo monoclonal 01A04 (subclon 02B10-02G07). La adición de 01A04 rescata la activación de HUVEC inducida por VEGF, medida por fosforilación de la cola citoplásmica de VEGF R^2 . El anticuerpo monoclonal 01A04 solo no tiene efecto sobre la fosforilación del receptor, mientras que la IgG de control no puede rescatar la señalización en presencia de VEGF y Flt-1 soluble.

FIG. 8 muestra fotomicrografías ilustrativas que ilustran la histopatología muscular mejorada mediante la administración de un anticuerpo anti-Flt-1. Se describe la mejoría en la patología muscular de mdx después del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-sFlt-1. Los animales se trataron con anticuerpo monoclonal comercial para sFlt-1 (Angio Proteomie, clon AP-MAB0702) o PBS como control. La fila superior muestra la tinción con tinte azul de Evans del músculo del diafragma. La segunda fila muestra la tinción de CD_{31} del músculo del diafragma para cuantificar los vasos sanguíneos. La tercera fila muestra la tinción con H+E del músculo del diafragma. La fila inferior muestra la tinción de Van Giesson del músculo del diafragma para cuantificar la fibrosis.

FIG. 9 muestra ejemplos de resultados que ilustran la cuantificación de marcadores histopatológicos que indican una histología muscular mejorada mediante la administración de un anticuerpo anti-Flt-1 a ratones. Se representa la cuantificación de los datos histopatológicos presentados en la Figura 8. El número de fibras azules positivas de Evans (panel superior), vasos sanguíneos CD_{31}^{+} (segundo panel); y los núcleos localizados centralmente (tercer panel) se contaron manualmente bajo un aumento de 4x y 10x. El área fibrótica total se cuantificó usando un software de análisis de imágenes (panel inferior). * = $p < 0,05$ por la prueba T no aparejada del alumno.

FIG. 10 muestra ejemplos de resultados que ilustran la cuantificación de marcadores histopatológicos que indican una histología muscular mejorada mediante la administración de un anticuerpo anti-Flt-1 a ratones. Se representa la cuantificación de los datos histopatológicos presentados en la Figura 8. Arriba: Fibras reducidas con núcleos ubicados centralmente (CLN) en el diafragma luego del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-Flt-1. Las fibras con CLN se contaron manualmente con un aumento de 4x y 10x. Abajo: Cambio leve a un tamaño de fibra mayor en el diafragma después del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-Flt-1. Los diámetros de fibra se contaron manualmente con un aumento de 4x y 10x. * = $p < 0,05$ por la prueba T no aparejada del

alumno.

FIG. 11 muestra ejemplos de resultados que ilustran la eficacia *in vivo* del anticuerpo Flt-1 en la función muscular. La administración de un anticuerpo Flt-1 a ratones mdx mejoró el rendimiento en la prueba de agarre (panel superior) y la prueba en cinta rodante (panel inferior) en comparación con los ratones mdx de control a los que se administró PBS. La fuerza de agarre animal se midió tres veces independientes por animal, con 30 minutos de separación para cada ensayo. La distancia total de la cinta de correr se midió 3 veces por animal.

FIG. 12 muestra ejemplos de resultados que ilustran la reducción *in vivo* de Flt1 soluble libre en el suero. La administración de un anticuerpo Flt-1 a ratones mdx provocó una reducción altamente significativa en los niveles de Flt1 soluble en la sangre en comparación con un anticuerpo de control de isotipo. Los animales se dosificaron a 20 mg/kg dos veces a la semana durante cuatro semanas comenzando a las 4 semanas de edad. En la necropsia, se recolectó sangre para el análisis de biomarcadores. *** $p < 0,001$ versus isotipo.

FIG. 13 muestra ejemplos de resultados que ilustran aumentos *in vivo* en la concentración de VEGF en suero. La administración de un anticuerpo Flt-1 a ratones mdx causó un aumento altamente significativo en los niveles de VEGF libre en la sangre en comparación con un anticuerpo de control de isotipo. Los animales se dosificaron a 20 mg/kg dos veces a la semana durante cuatro semanas comenzando a las 4 semanas de edad. En la necropsia, se recolectó sangre para el análisis de biomarcadores. *** $p = 0,0063$ frente al isotipo.

FIG. 14 muestra ejemplos de resultados que ilustran aumentos *in vivo* en la angiogénesis en el músculo del diafragma. La administración de un anticuerpo Flt-1 a ratones mdx causó un aumento significativo en la proliferación de células endoteliales, como se ejemplifica por la tinción de CD₃₁, en el músculo del diafragma en comparación con un anticuerpo de control de isotipo. Los animales se dosificaron a 20 mg/kg dos veces a la semana durante cuatro semanas comenzando a las 4 semanas de edad. En la necropsia, los tejidos se conservaron para histopatología. Se representa la tinción para CD₃₁, un marcador de células endoteliales. Hubo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el número de células endoteliales después del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-Flt-1. Los datos fueron analizados utilizando un software automatizado de imágenes cuantitativas. Las muestras fueron cegadas al investigador.

DEFINICIONES

[0023] A fin de que la presente invención se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Se establecen definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos a lo largo de la especificación.

[0024] Animal: Como se usa aquí, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, un ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal genéticamente modificado y/o un clon.

[0025] Anticuerpo: Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente producida sintéticamente. Todos los derivados de los mismos que mantienen la capacidad de unión específica también se incluyen en el término. El término también abarca cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Dichas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse parcial o totalmente sintéticamente. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede ser un miembro de la clase de inmunoglobulina IgG. Como se usa en el presente documento, los términos "fragmento de anticuerpo" o "porción característica de un anticuerpo" se usan indistintamente y se refieren a cualquier derivado de un anticuerpo que es menor que la longitud completa. En general, un fragmento de anticuerpo retiene al menos una parte significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpo dsFv y fragmentos Fd. Un fragmento de anticuerpo puede producirse por cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia de anticuerpo parcial. Alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede producirse total o parcialmente sintéticamente. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo monocatenario. Alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional típicamente comprende al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más típicamente comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo

puede ser un anticuerpo humanizado.

[0026] Fragmento de unión a antígeno: Como se usa aquí, el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una porción de una molécula de inmunoglobulina que contacta con y se une a un antígeno (*es decir*, Flt-1).

[0027] Aproximadamente o alrededor de: Como se usa aquí, el término "aproximadamente" o "alrededor de", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que cae dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo en el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100% de un posible valor).

[0028] Biológicamente activo: Como se usa aquí, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y en particular en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando un péptido es biológicamente activo, una porción de ese péptido que comparte al menos una actividad biológica del péptido se denomina típicamente como una porción "biológicamente activa". En ciertas realizaciones, un péptido no tiene actividad biológica intrínseca pero que inhibe la unión de uno o más ligandos de VEGF, se considera que es biológicamente activo.

[0029] Vehículo o diluyente: Como se utiliza aquí, los términos "vehículo" y "diluyente" se refieren a un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) o sustancia diluyente útil para la preparación de una formulación farmacéutica. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución tamponada de pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0030] Forma de dosificación: Como se utiliza aquí, los términos "forma de dosificación" y "forma de dosificación unitaria" se refieren a una unidad físicamente discreta de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo) para el paciente a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Se entenderá, sin embargo, que la dosificación total de la composición será decidida por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico.

[0031] Equivalente funcional o derivado: Como se usa aquí, el término "equivalente funcional" o "derivado funcional" denota, en el contexto de un derivado funcional de una secuencia de aminoácidos, una molécula que conserva una actividad biológica (funcional o estructural) que es sustancialmente similar a la de la secuencia original. Un derivado funcional o equivalente puede ser un derivado natural o se prepara sintéticamente. Los ejemplos de derivados funcionales incluyen secuencias de aminoácidos que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de uno o más aminoácidos, con la condición de que se conserve la actividad biológica de la proteína. El aminoácido sustituyente tiene deseablemente propiedades químico-físicas que son similares a las del aminoácido sustituido. Las propiedades químico-físicas similares deseables incluyen similitudes en carga, volumen, hidrofobicidad, hidrofiliidad y similares.

[0032] Proteína de Fusión: Como se usa aquí, el término "proteína de fusión" o "proteína quimérica" se refiere a una proteína creada mediante la unión de dos o más proteínas originalmente separadas, o porciones de las mismas. En algunas realizaciones, un enlazador o espaciador estará presente entre cada proteína.

[0033] Semivida: Como se usa aquí, el término "semivida" es el tiempo requerido para que una cantidad tal como la concentración de proteína o actividad caiga a la mitad de su valor medido al comienzo de un período de tiempo.

[0034] Hipertrofia: Como se usa aquí el término "hipertrofia" se refiere al aumento en el volumen de un órgano o tejido debido a la ampliación de sus células componentes.

[0035] Mejorar, aumentar o reducir. Como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores relativos a una medición de línea de base, tales como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en este documento, o una medición en un sujeto de control (o sujeto de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito en este documento. Un "sujeto de control" es un sujeto afligido con la misma forma de enfermedad que el sujeto que se trata, que tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que se está tratando.

[0036] In vitro: Como se usa aquí, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, por ejemplo, en un recipiente de tubo de ensayo o reacción, en cultivo de células, etc., en lugar de dentro de un organismo multi-celular.

[0037] In vivo: Como se usa aquí, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo multicelular, como un humano o un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (en oposición a, por ejemplo, sistemas

in vitro).

5 **[0038] Enlazador:** Como se usa aquí, el término "enlazador" se refiere a, en una proteína de fusión, una secuencia de aminoácidos distinta de la que aparece en una posición particular en la proteína natural y generalmente se diseña para ser flexible o interponerse una estructura, tal como una hélice α , entre dos restos proteicos. Un enlazador también se conoce como espaciador. Un enlace o un espaciador generalmente no tiene función biológica por sí mismo.

10 **[0039] Farmacéuticamente aceptable:** El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí, se refiere a sustancias que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

15 **[0040] Polipéptido:** El término "polipéptido" como se usa aquí, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la materia entenderá que el término no está limitado a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos mediante un enlace de péptido. Como saben los expertos en la técnica, los polipéptidos pueden procesarse y/o modificarse.

20 **[0041] Prevenir:** Como se usa aquí, el término "prevenir" o "prevención", cuando se utiliza en conexión con la aparición de una enfermedad, trastorno, y/o afección, se refiere a reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o condición. Ver la definición de "riesgo".

25 **[0042] Proteína:** El término "proteína" tal como se utiliza aquí se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si un único polipéptido es la unidad de funcionamiento discreto y no requiere asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos con el fin de formar la unidad de funcionamiento discreta, los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente. Si la unidad funcional discreta está compuesta por más de un polipéptido que se asocia físicamente entre sí, el término "proteína" se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y funcionan juntos como la unidad discreta.

30 **[0043] Riesgo:** Como se entenderá a partir del contexto, un "riesgo" de una enfermedad, trastorno, y/o condición comprende una probabilidad de que un individuo particular desarrollará una enfermedad, trastorno, y/o condición (por ejemplo, DMD). En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas realizaciones, el riesgo es de 0, 1, 2, 3, 4,5,6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta 100%. En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un riesgo relativo a un riesgo asociado con una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia. En algunas realizaciones, una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia tiene un riesgo conocido de una enfermedad, trastorno, afección y/o evento (por ejemplo, DMD). En algunas realizaciones, una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia son de individuos comparables a un individuo particular. En algunas realizaciones, el riesgo relativo es 0, 1, 2, 3, 4,5,6, 7, 8, 9, 10 o más.

35 **[0044] Músculo estriado:** Como se usa aquí, el término "músculo estriado" se refiere a tejido muscular multinucleado con disposición regular de sus unidades contráctiles intracelulares, sarcómeros, lo que lleva a la aparición de estrías utilizando microscopía y bajo control voluntario. Típicamente, el músculo estriado puede ser músculo cardíaco, músculo esquelético y músculos branquioméricos.

40 **[0045] Músculo liso:** Como se usa aquí, el término "músculo liso" se refiere a controlado involuntariamente, músculo no estriado, incluyendo músculo unitario y multiunitario.

45 **[0046] Sujeto:** Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un humano o cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdos, oveja, caballo o primate). Un ser humano incluye formas prenatales y postnatales. En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un humano que se presenta a un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa en este documento indistintamente con "individuo" o "paciente". Un sujeto puede estar afectado o ser susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede mostrar o no los síntomas de la enfermedad o trastorno.

50 **[0047] Sustancialmente:** Como se usa aquí, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir extensión o grado de una propiedad característica o de interés total o casi total. Un experto en artes biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o completan o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

55 **[0048] Homología sustancial:** La frase "homología sustancial" se utiliza aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos normales en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los

residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien sabido por los expertos en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución "homóloga".

[0049] Como es bien conocido en esta técnica, secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico pueden ser comparadas utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas de ordenador comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST espaciado, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Los ejemplos de este programa se describen en Altschul, et al., basic local alignment search tool, J. Mol. Biol, 215 (3): 403- 410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs ", Nucleic Acids Res. 25: 3389- 3402, 1997; BaX-~~evanis~~, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente suelen proporcionar una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, se considera que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un tramo relevante de residuos. En algunas realizaciones, el estiramiento relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

[0050] *Identidad sustancial*: La frase "identidad sustancial" se usa en el presente documento para hacer referencia a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos normales en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en posiciones correspondientes. Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden comparar utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST segregado y PSI-BLAST para secuencias aminoácidas. Los ejemplos de tales programas se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol, 215 (3): 403- 410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389- 3402, 1997; BaX-~~evanis~~ et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente suelen proporcionar una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un tramo relevante de residuos. En algunas realizaciones, el estiramiento relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

[0051] *Sufrimiento de*: Un individuo que está "sufriendo de" una enfermedad, trastorno, y/o condición ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno, y/o condición.

[0052] *Susceptible a*: Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, afección o evento (por ejemplo, DMD) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o condición; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o condición; (3) expresión aumentada y/o disminuida y/o actividad de una proteína asociada con la enfermedad, trastorno y/o condición; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno, afección y/o evento (5) haberse sometido a, destinarse a someterse a o que requiera un trasplante. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

[0053] *Tejidos diana*: Como se usa aquí, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido que se ve afectado por una enfermedad a tratar, tales como DMD. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que presentan patología, síntomas o características asociadas a la enfermedad, que incluyen, pero no se limitan a, pérdida muscular, deformación esquelética, cardiomiopatía, isquemia muscular, deterioro cognitivo y función respiratoria deteriorada.

[0054] *Cantidad terapéuticamente eficaz*: Como se usa aquí, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico, significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o condición, a tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición del

síntoma de la enfermedad, trastorno y/o condición. Los expertos en la técnica apreciarán que una cantidad terapéuticamente eficaz se administra típicamente a través de un régimen de dosificación que comprende al menos una dosis unitaria.

5 **[0055]** *Tratar*: Como se usa aquí, el término "tratar", "tratamiento" o "tratar" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar parcial o completamente, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o condición en particular. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad y/o muestra solo
10 signos tempranos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS FORMAS DE REALIZACIÓN

15 **[0056]** La presente invención proporciona un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en el que el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibe la unión del receptor VEGF a Flt-1. También se describen métodos y composiciones para tratar la distrofia muscular, que incluyen distrofia muscular de Duchenne (DMD) y/o Distrofia Muscular Becker, basada en anticuerpos anti-Flt-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como agentes terapéuticos. Se describen métodos para tratar DMD, que incluyen administrar a un individuo que padece o es
20 susceptible a DMD una cantidad eficaz de un anticuerpo Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de manera que al menos un síntoma o característica de DMD se reduce en intensidad, gravedad, o frecuencia, o tiene un inicio retrasado.

25 **[0057]** Se describen varios aspectos de la invención en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

30 **[0058]** La DMD es una enfermedad caracterizada por el deterioro progresivo de los músculos y la pérdida de funciones relacionadas con los músculos en todo el cuerpo. También se describen métodos y composiciones para ralentizar, retrasar o prevenir el deterioro de los músculos, regenerar los músculos y revertir, eliminar, retrasar, prevenir o minimizar la fibrosis, inflamación y otros síntomas o características asociadas con la DMD y otras distrofias musculares en diversos tejidos musculares.

Tejidos musculares

35 **[0059]** Hay dos tipos principales de tejido muscular en un animal - músculo estriado y músculo liso. Como se usa en este documento, el término "músculo estriado" se refiere a los tejidos musculares que contienen sarcómeros repetidos. El músculo estriado tiende a estar bajo control voluntario y unido al esqueleto. El músculo estriado permite el movimiento voluntario del cuerpo e incluye los principales grupos musculares, incluidos el cuádriceps, gastrocnemio, bíceps, tríceps, trapecio, deltoides y muchos otros. El músculo estriado tiende a ser muy largo y muchos músculos estriados pueden funcionar de forma independiente. Sin embargo, algunos músculos estriados no están unidos al esqueleto, incluidos los de la boca, el ano, el corazón y la porción superior del esófago.

40 **[0060]** El músculo liso, por otro lado, tiene una estructura muy diferente. En lugar de una serie de músculos largos con inserciones esqueléticas separadas, el músculo liso tiende a organizarse en láminas continuas con enlaces mecánicos entre las células del músculo liso. El músculo liso a menudo se encuentra en las paredes de los órganos huecos y generalmente no está bajo control voluntario. Los músculos lisos que recubren un órgano particular deben soportar la misma carga y contrato al mismo tiempo. Funciones suaves del músculo, al menos en parte, para manejar los cambios de carga en los órganos huecos causados por el movimiento y/o cambios en la postura o la presión. Esta doble función significa que el músculo liso no solo debe poder contraerse como el músculo estriado, sino también que debe poder contraerse tónicamente para mantener las dimensiones de los órganos frente a las cargas sostenidas. Los ejemplos de músculos lisos son aquellos que recubren los vasos sanguíneos, los
45 bronquiolos, la vejiga y el tracto gastrointestinal, como el recto.

50 **[0061]** La fuerza de un músculo depende del número y tamaño de las células del músculo y en su disposición anatómica. El aumento del diámetro de una fibra muscular mediante la síntesis de nuevas miofibrillas (hipertrofia) y/o la formación de más células musculares (hiperplasia) aumentará la capacidad de generación de fuerza del músculo.

55 **[0062]** Los músculos también se pueden agrupar por ubicación o función. En algunas realizaciones, un anticuerpo Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se dirige a uno o más músculos de la cara, uno o más músculos para la masticación, uno o más músculos de la lengua y el cuello, uno o más músculos del tórax, uno o más músculos de la cintura pectoral y los brazos, uno o más músculos del brazo y el hombro, uno o más músculos ventrales y dorsales del antebrazo, uno o más músculos de la mano, uno o más músculos del erector espinal, uno o
60 más músculos de la cintura y las piernas pélvicas y/o uno o más músculos de la pata delantera y el pie.

5 **[0063]** En algunas realizaciones, los músculos de la cara incluyen, pero no se limitan a, los músculos intraoculares tales como ciliar, dilatador del iris, esfínter del iris; músculos del oído tales como auriculares, temporoparietalis, stapedius, tensor timpánico; músculos de la nariz tales como procerus, nasalis, dilatador naris, depresor septi nasi, elevador labii superioris alaeque nasi; músculos de la boca tales como levator anguli oris, depresor anguli oris, orbicularis oris, Buccinador, zigomático mayor y menor, platisma, Levator Labii Superioris, Depresor Labii Inferioris, Risorius, Mentalis, y/o Corrugator Supercilii.

10 **[0064]** En algunas realizaciones, los músculos de la masticación incluyen, pero no se limitan a, Masetero, Temporalis, Pterigoideo Medial, Pterigoideo Lateral. En algunas realizaciones, los músculos de la lengua y el cuello incluyen, pero sin limitación, el geniogloso, el estilogloso, el palatogloso, el hiogloso, digástrico, estilohioide, milohioide, geniohioide, omohioide, esternohioide, esternotiroide, tirohioide, esternocleidomastoide, escaleno anterior, escaleno medio, y/o escaleno posterior.

15 **[0065]** En algunas realizaciones, los músculos del tórax, cintura escapular, y los brazos incluyen, pero no se limitan al subclavio pectoral mayor, pectoral menor, recto abdominal, oblicuo abdominal externo, oblicuo abdominal interno, transverso del abdomen, diafragma, intercostales externos, intercostales internos, serrato anterior, trapecio, escapulo del elevador, romboideo mayor, romboideo menor, dorsal ancho, deltoides, subescapular, supraespinoso, infraespinoso, redondo mayor, redondo menor y/o coracobraquial.

20 **[0066]** En algunas realizaciones, los músculos del brazo y el hombro incluyen, pero no se limitan a, bíceps braquiales-cabeza larga, bíceps braquiales-cabeza corta, tríceps braquiales-cabeza larga, tríceps braquiales-cabeza lateral, tríceps braquiales-cabeza medial, ancóneo, pronador redondo, supinador y/o brachialis.

25 **[0067]** En algunas realizaciones, los músculos del antebrazo ventral y dorsal incluyen, pero no se limitan a, braquiorradial, flexor radial del carpo, flexor cubital del carpo, palmar largo, extensor cubital del carpo, extensor carpi radial largo, extensor radial brevis, extensor digitorum, extensor digiti minimi.

30 **[0068]** En algunas realizaciones, los músculos de la mano incluyen, pero no se limitan a los músculos intrínsecos de la mano, tales como tenar, abductor pollicis brevis, flexor pollicis brevis, oponente del pulgar, hipotenar, abductor, el flexor del meñique brevis, opponens digiti minimi, interossei palmar, interossei dorsal y/o lumbricales.

[0069] En algunas realizaciones, los músculos del erector de la columna incluyen, pero no se limitan a, cervicalis, spinalis, issimus largo, y/o iliocostalis.

35 **[0070]** En algunas realizaciones, los músculos de la cintura pélvica y las piernas incluyen, pero no se limitan a, psoas mayor, ilíaco, cuadrado femoral, aductor largo, aductor corto, aductor mayor, Gracilis, Sartorius, cuádriceps femoral, tales como, rectus femoral, vasto lateral, vasto medial, vasto intermedio, Gastrocnemio, Fibularis (Peroneo) longus, soleo, glúteo mayor, glúteo medio, glúteo menor, tendones de la corva: bíceps femoral: cabeza larga, cuerdas de hastial: bíceps femoral: cabeza corta, tendones de la corva: semitendinoso, tendones de la corva: semimembranoso, tensor de la fascia lata, pectíneo y/o tibial anterior.

45 **[0071]** En algunas realizaciones, los músculos de la pata delantera y del pie incluyen, pero no se limitan al extensor largo de los dedos, extensor largo del dedo gordo, peroneus brevis, plantar, tibialis posterior, flexor largo del dedo gordo, extensor digitorum brevis, extensor hallucis brevis, abductor hallucis, flexor hallucis brevis, abductor digiti minimi, flexor digiti minimi, opponens digiti minimi, extensor digitorum brevis, lumbricales del pie, Quadratus plantae o flexor accessorius, flexor digitorum brevis, interossei dorsal y/o interóseos plantares.

[0072] Los objetivos musculares ejemplares se resumen en la Tabla 1.

50 Tabla 1

ORBICULAR DE LOS OJOS			
Intraocular: ciliar, dilatador del iris, esfínter del iris			
Oído: auriculares, temporoparietal, estapedio, tensor timpánico			
Nariz: prócer, nasal, dilatador nasal, depresor del tabique nasal, elevador del labio superior y del ala de la nariz			
Boca: elevador del ángulo de la boca, depresor del ángulo de la boca, orbicular de la boca			
Buccinador	Zigomático mayor y menor	Platisma	Elevador del labio superior
Depresor del labio inferior	Risorio	Mentalis	Corrugador superciliar
Ancóneo	Pronador redondo	Supinador	Braquialis
MÚSCULOS DE MASTICACIÓN			
Masetero	Temporal	Pterigoideo medial	Pterigoideo lateral

(continúa)

MÚSCULOS DE LA LENGUA Y DEL CUELLO			
Geniogloso	Estilogloso	Palatogloso	Hiogloso
Digástrico	Estilohioide	Milohioide	Geniohioide
Omohioide	Esternohioide	Esternotiroide	Tirohioide
Esternocleidomastoide	Escaleno anterior	Escaleno medio	Escaleno posterior
MÚSCULOS DEL TÓRAX, CINTURA ESCAPULAR Y BRAZOS			
Subclavio	Pectoral mayor	Pectoral menor	Recto abdominal
Oblicuo externo del abdomen	Oblicuo interno del abdomen	Transverso del abdomen	Diafragma
Intercostales externos	Intercostales internos	Serrato anterior	Trapezio
Elevador de la escápula	Romboides mayor	Romboides menor	Dorsal ancho
Deltoide	subscapular	supraespinoso	infraespinoso
Redondo mayor	Redondo menor	Coracobraquial	
BRAZO Y HOMBRO			
Bíceps braquial-Cabeza larga	Bíceps braquial-Cabeza corta	Tríceps braquial-Cabeza larga	Tríceps braquial-Cabeza lateral
Tríceps braquial-Medial Head	Anconeus	Pronator teres	Supinador
Brachialis			
MÚSCULOS DEL ANTEBRAZO: Ventral y Dorsal			
Braquiorradial	Flexor radial del carpo	Flexor cubital del carpo	Palmar largo
Extensor del carpo cubital	Extensor del carpo radial largo	Extensor del carpo radial corto	Extensor de los dedos
Extensor propio del meñique	erector de la columna: cervical	erector de la columna: espinoso	erector de la columna: longísimo
erector de la columna: iliocostal			
Músculos intrínsecos de la mano: tenar, abductor pollicis brevis, flexor pollicis brevis, y el oponente del pulgar			
Músculos intrínsecos de la mano: hipotenar, abductor corto de los dedos, el flexor corto del meñique, y el oponente corto de los dedos			
Músculos intrínsecos de la mano: interóseos palmares, interóseos dorsales y lumbricales			
MÚSCULOS DE LA FAJA PÉLVICA Y DE LAS PIERNAS			
Iliopsoas: Psoas Mayor	Iliopsoas: Iliaco	cuadrado femoris	Aductor largo
Aductor corto	Aductor mayor	Músculo grácil	Músculo sartorio
Cuadriceps femoral: recto femoral	Cuadriceps femoral: vasto lateral	Cuadriceps femoral: vasto medial	Cuadriceps femoral: vasto intermedio
Gastrocnemio	Peroneo largo	Músculo sóleo	Glúteo mayor
Glúteo medio	Glúteo menor	Isquiotibiales: Bíceps femoral: cabeza larga	Isquiotibiales: Bíceps femoral: cabeza corta
Isquiotibiales: Semitendinoso	Isquiotibiales: Semimembranoso	Tensor fasciae latae	Pectíneo
Tibial anterior			

(continúa)

MÚSCULOS DE LA PATA DELANTERA Y DE LA PIERNA			
5	Extensor largo de los dedos	Extensor largo del dedo gordo	peroneo corto plantar
	Tibial posterior	flexor largo del dedo gordo	extensor corto de los dedos extensor corto del dedo gordo
10	Abductor hallucis	flexor corto del dedo gordo	Abductor corto de los dedos flexor corto de los dedos
	músculo oponente del dedo meñique	extensor corto de los dedos	lumbricales del pie Cuadrado plantar o flexor accessorius
15	Flexor corto de los dedos	interóseos dorsales	interóseos plantares

Distrofia muscular

[0073] Las distrofias musculares son un grupo de trastornos hereditarios que causan la degeneración del músculo, dando lugar a movimientos débiles y alterados. Una característica central de todas las distrofias musculares es que son de naturaleza progresiva. Las distrofias musculares incluyen, pero no se limitan a: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioescapulohumeral, cintura de las extremidades. distrofias musculares y distrofia miotónica Tipos 1 y 2, incluida la forma congénita de la distrofia miotónica Tipo 1. Los síntomas pueden variar según el tipo de distrofia muscular con algunos o todos los músculos afectados. Los síntomas ejemplares de las distrofias musculares incluyen retraso en el desarrollo de las habilidades motoras, dificultad para usar uno o más grupos musculares, dificultad para tragar, hablar o comer, babeo, caída de los párpados, caída frecuente, pérdida de fuerza en un músculo o grupo de músculos como adulto, pérdida de tamaño muscular, problemas para caminar debido a debilidad o alteración de la biomecánica del cuerpo, y/o deterioro cognitivo o conductual/retraso mental.

[0074] Si bien no hay cura conocida para las distrofias musculares, se utilizan varios tratamientos de apoyo que incluyen terapias tanto sintomáticas como modificadoras de la enfermedad. Los corticosteroides, los inhibidores de ECA, los bloqueadores del receptor de angiotensina, la fisioterapia, los dispositivos ortopédicos, las sillas de ruedas u otros dispositivos médicos auxiliares para las ADL y la función pulmonar se usan comúnmente en las distrofias musculares. Los marcapasos cardíacos se utilizan para prevenir la muerte súbita por arritmias cardíacas en la distrofia miotónica. Los agentes antimotónicos que mejoran los síntomas de la miotonía (incapacidad para relajarse) incluyen mexilina, y en algunos casos fenitoína, procainamida y quinina.

Distrofia muscular de Duchenne

[0075] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una forma recesiva ligada a X de distrofia muscular que da como resultado la degeneración muscular y la muerte eventual. La DMD se caracteriza por debilidad en los músculos proximales, marcha anormal, hipertrofia en los músculos del gastrocnemio (gemelos) y la quinasa de creatina elevada. Muchos pacientes con DMD son diagnosticados alrededor de los 5 años, cuando los síntomas/signos generalmente se vuelven más obvios. Las personas afectadas por lo general dejan de caminar entre los 10 y 13 años de edad y mueren durante o antes de los 20 debido a una disfunción cardiorrespiratoria.

[0076] El trastorno DMD es causado por una mutación en el gen de la distrofina, que se encuentra en el cromosoma X humano, que codifica para la proteína distrofina, un componente estructural importante dentro del tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al complejo distroglicano (DGC) de la membrana celular. La distrofina une la red de filamentos de actina citoplásmica interna y la matriz extracelular, proporcionando fuerza física a las fibras musculares. En consecuencia, la alteración o la ausencia de distrofina da como resultado un desgarramiento anormal de la membrana del sarcoleón y necrosis de las fibras musculares. Si bien ambos sexos pueden portar la mutación, las mujeres rara vez exhiben signos severos de la enfermedad.

[0077] Un síntoma principal de la DMD es la debilidad muscular asociada con atrofia muscular con los músculos voluntarios siendo afectados primero típicamente, afectando especialmente a los músculos de las caderas, área pélvica, muslos, hombros y músculos de la pantorrilla. La debilidad muscular también ocurre en los brazos, el cuello y otras áreas. Los gemelos a menudo se agrandan. Los signos y síntomas generalmente aparecen antes de los 6 años de edad y pueden aparecer desde la infancia. Otros síntomas físicos incluyen, entre otros, el retraso en la capacidad para caminar de forma independiente, dificultad progresiva para caminar o correr, y la eventual pérdida de la capacidad para caminar (generalmente a la edad de 12 años); caídas frecuentes; fatiga; dificultad con las habilidades motoras (correr, saltar); aumento de la lordosis lumbar, lo que conduce a un acortamiento de los músculos flexores de la cadera; funcionalidad alterada del tendón de Aquiles y los isquiotibiales, fibrosis en el tejido conectivo; deformidades de la fibra muscular; pseudohipertrofia (agrandamiento) de los músculos de la lengua y la pantorrilla causados por el reemplazo del tejido muscular por grasa y tejido conectivo; mayor riesgo de trastornos

neuroconductuales (p. ej., TDAH), trastornos del aprendizaje (dislexia) y debilidades no progresivas en habilidades cognitivas específicas (en particular, memoria verbal a corto plazo); deformidades esqueléticas (incluida la escoliosis en algunos casos).

5 **Receptor Flt-1**

[0078] El receptor de Flt-1, también conocido como receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular, es un receptor que está codificado por el gen FLT1. La familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de glicoproteínas de señal actúa como promotores potentes de la angiogénesis durante la embriogénesis y el crecimiento posnatal. Específicamente, se ha demostrado que la unión del ligando de VEGF-A con los receptores de VEGF promueve la permeabilidad vascular y también desencadena la migración, proliferación y supervivencia de células endoteliales, y las células endoteliales recién formadas proporcionan la estructura básica de nuevas vasculaturas. La molécula de señal VEGF dominante para la angiogénesis, VEGF-A, media su señal a través del receptor VEGF-1 (VEGFR-1, también conocido como Flt-1) y receptor VEGF-2 (VEGFR-2, también conocido como Flk-1). También existe una forma soluble de Flt-1 (sFlt-1), pero carece de un dominio de señalización intracelular y, por lo tanto, se cree que solo sirve en una capacidad reguladora mediante el secuestro de VEGF-A u otros ligandos que se unen a él. El sFlt-1 y otras moléculas que contienen sitios de unión a Flt-1 que no están unidos a una vía de transducción de señal intracelular se denominan receptores señuelo. Los receptores Flt-1 y Flk-1 contienen un dominio de unión a VEGF-A extracelular y un dominio de quinasa de tirosina intracelular, y ambos muestran expresión durante la etapa de desarrollo y regeneración tisular en hemangioblastos y linajes de células endoteliales. Flt-1 tiene aproximadamente 10 veces mayor afinidad de unión por VEGF-A (Kd ~2-10 pM) en comparación con Flk-1, pero el dominio de quinasa de tirosina más débil indica que la transducción de señal angiogénica después de la unión de VEGF-A a Flt-1 es comparativamente más débil que la señal de Flk-1. Como tal, los ratones knockout del gen Flt-1 homocigoto mueren en el paso embrionario a partir de la sobreproducción de células endoteliales y la desorganización de los vasos sanguíneos. Inversamente, los ratones knockout del gen Flk-1 homocigotos mueren por defectos en el desarrollo de vasos sanguíneos organizados debido a la falta de formación de islotes de sangre del saco vitelino durante la embriogénesis. Los receptores Flt-1 y Flk-1 son necesarios para el desarrollo normal, pero el aumento selectivo en la concentración de VEGF-A puede permitir una mayor unión al receptor Flk-1 e inducir un efecto proangiogénico que aumenta la densidad capilar y facilita la regeneración de músculo, reducción de la fibrosis y la inflamación, y mitigación de los síntomas y las características asociadas con la DMD y otras distrofias musculares en diversos tejidos musculares.

[0079] Tal como se utiliza aquí, el término "receptor Flt-1" se refiere a receptores Flt-1 asociados tanto solubles y de membrana, o fragmentos funcionales de los mismos.

35 **Anticuerpos anti-Flt-1**

[0080] Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpos anti-Flt-1" se refiere a cualesquiera anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de los mismos, que se unen a un receptor Flt-1 (por ejemplo, receptor Flt-1 soluble o asociado a membrana) e inhibe unión de VEGF al receptor Flt-1. En algunas realizaciones, se producen anticuerpos anti-Flt-1 que se unen con alta afinidad a los receptores Flt-1. El anticuerpo anti-Flt-1 que se une a los receptores Flt-1 inhibe la unión de uno o más ligandos endógenos a Flt-1 y permite una mayor cantidad de ligando disponible para asociarse con otros receptores de VEGF, como el receptor Flk-1. En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo a receptores de Flt-1 aumenta la cantidad de VEGF disponible para unirse a otros receptores de VEGF. En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo a receptores de Flt-1 aumenta la cantidad de factor de crecimiento placentario (PLGF) disponible para unirse a otros receptores de VEGF.

[0081] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se une Flt-1 humano con una afinidad mayor que alrededor de 10^{-9} M, más de aproximadamente 10^{-10} M, más de aproximadamente $0,5 \times 10^{-10}$ M, mayor que aproximadamente 10^{-11} M, mayor que aproximadamente $0,5 \times 10^{-11}$ M, mayor que aproximadamente 10^{-12} M, o mayor que aproximadamente $0,5 \times 10^{-12}$ M. La afinidad de un anticuerpo Flt-1 puede medirse, por ejemplo, en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, tal como un ensayo BIACORE.

[0082] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por un CI_{50} por debajo de 100 pM, por debajo de 10 pM, o por debajo de 1 pM en un ensayo de competición con Flt-1 humana.

[0083] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la actividad de unión y/o de VEGF en el receptor Flt-1. En algunas formas de realización, un anti-Flt-1 anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por un CI_{50} por debajo de 100 pM, inferior a 10 pM, o inferior a 1 pM para la inhibición de la unión de VEGF a Flt-1 humana en un ensayo de competencia.

[0084] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la actividad de unión y/o de PLGF en el receptor Flt-1. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por un CI_{50} pM por debajo de 100, por debajo de 10 pM, o por debajo de 1 pM para la inhibición de la unión de PLGF a Flt-1 humana en un ensayo de competición.

[0085] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno se une de la misma manera selectiva Flt-1 y tiene una unión mínima o no apreciable a otros receptores de VEGF. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une selectivamente a Flt-1 y tiene una unión mínima o no apreciable a VEGFR2 (Flk-1) y/o VEGFR3 (Flt-4).

[0086] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une selectivamente Flt-1 humana, y tiene una mínima o ninguna unión a otros receptores Flt-1 de mamíferos (por ejemplo, con una afinidad de unión de menos de 10^{-7} M o 10^{-6} M). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une selectivamente a Flt-1 humana y no se une a la Flt-1 de mono. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une selectivamente a Flt-1 humana y no se une a Flt-1 de ratón.

[0087] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une Flt-1 humano, así como Flt-1 de mono. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a Flt-1 humana así como a Flt-1 de ratón.

[0088] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste en IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, ScFvs, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

[0089] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es IgG. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es IgG1.

[0090] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1 adecuado contiene un dominio Fc o una porción del mismo que se une al receptor FcRn. Como ejemplo no limitante, un dominio Fc adecuado puede derivarse de una subclase de inmunoglobulina tal como IgG. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado se deriva de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los dominios Fc particularmente adecuados incluyen aquellos derivados de anticuerpos humanos o humanizados.

[0091] Se contempla que la mejora de la unión entre el dominio Fc y los resultados de receptor FcRn en vida media de suero prolongada. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones de aminoácidos que conducen a una unión mejorada a FcRn. En la técnica se conocen diversas mutaciones dentro del dominio Fc que efectúan una unión mejorada a FcRn y pueden adaptarse para practicar la presente invención. En algunas realizaciones, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433, y/o Asn 434 de IgG1 humana.

[0092] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-FLT-1 o fragmento de unión a antígeno contiene un espaciador y/o está unido a otra entidad. En algunas realizaciones, el enlazador o espaciador comprende una secuencia de al menos 50% (por ejemplo, al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntico a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 1) (enlace GAG). En algunas realizaciones, el enlazador o espaciador comprende una secuencia de al menos 50% (por ejemplo, al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntico a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 2) (enlace GAG2). En algunas realizaciones, el enlazador o espaciador comprende una secuencia de al menos 50% (por ejemplo, al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntico a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGG GAP (SEQ ID NO: 3) (enlace GAG3).

Producción de anticuerpos anti-Flt-1 y fragmentos de unión a antígenos

[0093] Un anticuerpo anti-Flt-1 recombinante o fragmento de unión de antígeno adecuado para el uso en la presente invención se pueden producir por cualquier medio disponible. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno puede producirse de manera recombinante utilizando un sistema de célula hospedadora diseñado para expresar un anticuerpo anti-Flt-1 recombinante o un ácido nucleico que codifica un fragmento de unión a antígeno.

[0094] Cuando los anticuerpos se producen recombinantemente, cualquier sistema de expresión puede usarse. Para dar solo algunos ejemplos, los sistemas de expresión conocidos incluyen, por ejemplo, células de huevo, baculovirus, plantas, levaduras o mamíferos.

[0095] En algunas realizaciones, el antígeno anti-Flt-1 recombinante o fragmentos de unión a antígenos adecuados para su uso en la presente invención se producen en células de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651);

[0096] En algunas realizaciones, la presente invención utiliza anticuerpo anti-FIt-1 recombinante o fragmento de unión a antígeno producido a partir de células humanas. En algunas realizaciones, la presente invención usa anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno producido a partir de células CHO.

5 Composición y administración farmacéutica

[0097] También se describe una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno descrito aquí y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

10 [0098] Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma árabe, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como
15 combinaciones de los mismos. Si se desea, las preparaciones farmacéuticas se pueden mezclar con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares) que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos o interfiere con su actividad. En una realización preferida, se usa un vehículo soluble en agua adecuado para administración intravenosa.

20 [0099] Una composición farmacéutica adecuada o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Una composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, tableta, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. Una composición también se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de
25 manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

30 [0100] Se puede formular una composición farmacéutica o medicamento de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración a seres humanos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición para administración intravenosa típicamente es una solución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o
35 concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, puede prescindirse de una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

40

Vías de administración

[0101] Un anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente memoria (o una composición o medicamento que contiene un anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en este documento)
45 se administra por cualquier vía apropiada. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-FIt-1 o una proteína de fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica que contiene el mismo se administra por vía parenteral. La administración parenteral puede ser por administración intravenosa, intradérmica, intratecal, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea, intramuscular y/o transmucosa. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica que
50 contiene el mismo se administra por vía subcutánea. Como se usa en el presente documento, el término "tejido subcutáneo" se define como una capa de tejido conjuntivo irregular suelta inmediatamente debajo de la piel. Por ejemplo, la administración subcutánea puede realizarse inyectando una composición en áreas que incluyen, pero no se limitan a la región del muslo, la región abdominal, la región glútea o la región escapular. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-FIt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición farmacéutica que contiene
55 el mismo se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica que contiene el mismo se administra por vía oral. Se puede usar más de una vía concurrentemente, si se desea.

60 [0102] En algunas realizaciones, la administración da como resultado únicamente un efecto localizado en un individuo, mientras que en otras realizaciones, la administración da como resultado efectos en múltiples porciones de un individuo, por ejemplo, efectos sistémicos. Típicamente, la administración da como resultado la administración de un anticuerpo anti-FIt-1 o fragmento de unión a antígeno a uno o más tejidos diana incluyendo, entre otros, riñón, hígado, cerebro, médula espinal, tracto intestinal, ojo, pulmón, bazo, corazón, estriado músculo y músculo liso.

65 [0103] En algunas realizaciones, el músculo estriado se selecciona del grupo que consiste en tríceps, tibial anterior, sóleo, gastrocnemio, cuádriceps y diafragma.

Formas de dosificación y régimen de dosificación

[0104] En algunas realizaciones, una composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o de acuerdo con un régimen de dosificación que se correlaciona con un resultado deseado particular (por ejemplo, con el tratamiento o la reducción de riesgo de una distrofia muscular, como la distrofia muscular de Duchenne)

[0105] Las dosis en particular o cantidades a administrar de acuerdo con el uso de la presente invención puede variar, por ejemplo, dependiendo de la naturaleza y/o la extensión del resultado deseado, en los detalles de la vía y/o el calendario de administración, y/o en una o más características (p. ej., peso, edad, historial personal, característica genética, parámetro de estilo de vida, gravedad del defecto cardíaco y/o nivel de riesgo de defecto cardíaco, etc., o combinaciones de los mismos). Tales dosis o cantidades pueden ser determinadas por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, se determina una dosis o cantidad apropiada de acuerdo con técnicas clínicas estándar. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, se determina una dosis o cantidad apropiada mediante el uso de uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación deseables u óptimos o las cantidades a administrar.

[0106] En diversas realizaciones, un anticuerpo anti-Fit-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o condición subyacente). En algunas realizaciones particulares, las dosis o cantidades apropiadas a administrar pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos *in vitro* o animal.

[0107] En algunas realizaciones, se proporciona una composición proporcionada como una formulación farmacéutica. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica es o comprende una cantidad de dosis unitaria para administración de acuerdo con un régimen de dosificación correlacionado con el logro de la incidencia o riesgo reducido de una distrofia muscular, tal como distrofia muscular de Duchenne.

[0108] En algunas realizaciones, una formulación que comprende un anticuerpo anti-Fit-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en este documento administrado como una dosis única. En algunas realizaciones, una formulación que comprende un anticuerpo anti-Fit-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente memoria se administra a intervalos regulares. La administración en un "intervalo", como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (a diferencia de una dosis única). El intervalo puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. En algunas realizaciones, una formulación que comprende un anticuerpo anti-Fit-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en este documento se administra cada dos meses, dos veces al mes, tres veces por semana, dos veces por semana, dos veces por semana, tres veces por semana, dos veces al día o cada seis horas. El intervalo de administración para un solo individuo no necesita ser un intervalo fijo, pero puede variar a lo largo del tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo.

[0109] Tal como se utiliza aquí, el término "bimensual" significa la administración una vez cada dos meses (es decir, una vez cada dos meses); el término "mensual" significa administración una vez al mes; el término "triseptanal" significa administración una vez cada tres semanas (es decir, una vez cada tres semanas); el término "biseptanal" significa administración una vez cada dos semanas (es decir, una vez cada dos semanas); el término "septanal" significa administración una vez por semana; y el término "diario" significa la administración una vez por día.

[0110] En algunas realizaciones, una formulación que comprende un anticuerpo anti-Fit-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente memoria se administra a intervalos regulares indefinidamente. En algunas realizaciones, una formulación que comprende un anticuerpo anti-Fit-1 o fragmento de unión a antígeno descrito en la presente memoria se administra a intervalos regulares durante un período definido.

[0111] En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-Fit-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo reduce la intensidad, gravedad o frecuencia, o retrasa la aparición de al menos un signo o síntoma de DMD. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-Fit-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo reduce la intensidad, gravedad o frecuencia, o retrasa la aparición de al menos un signo o síntoma de DMD seleccionado del grupo que consiste en pérdida muscular, deformación esquelética, cardiomiopatía, isquemia muscular, deterioro cognitivo y función respiratoria deteriorada.

[0112] En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-Fit-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo mejora el resultado clínico medido mediante una prueba de caminata de 6 minutos, prueba de fuerza muscular cuantitativa, prueba de rendimiento del motor temporizado. Escalas de función de las extremidades de Brooke y Vignos, la prueba de función pulmonar (capacidad vital forzada, volumen espiratorio forzado en 1 segundo, flujo espiratorio máximo, presiones inspiratorias y espiratorias máximas), calidad de vida relacionada con la salud, flexores de rodilla y codo, extensores de codo, hombro abducción, fuerza de agarre, tiempo para levantarse de la posición supina, Evaluación Ambulatoria de North Star, 10 metros a pie/carrera, escala Egen-Klassification, puntuación de Gowers, habilidad de Hammersmith, miometría a mano, rango de movimiento, goniometría, hipercapnia, Escalas Nayley del desarrollo de bebés y niños pequeños, y/o una escala de carga para cuidadores.

Terapia de combinación

[0113] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos conocidos (por ejemplo, corticosteroides) actualmente usados para el tratamiento de una distrofia muscular. En algunas realizaciones, el (los) agente(s) terapéutico(s) conocido(s) se administra(n) de acuerdo con su régimen y/o cronograma de dosificación estándar o aprobado. En algunas realizaciones, el (los) agente(s) terapéutico(s) conocido(s) se administra(n) de acuerdo con un régimen que se altera en comparación con su régimen y/o programa de dosificación estándar o aprobado. En algunas realizaciones, dicho régimen alterado difiere del régimen de dosificación estándar o aprobado en que una o más dosis unitarias están alteradas (por ejemplo, reducidas o aumentadas) en cantidad, y/o en que la dosificación está alterada en frecuencia (por ejemplo, en que uno o más intervalos entre dosis unitarias se expande, lo que resulta en una frecuencia más baja, o se reduce, lo que resulta en una frecuencia más alta).

EJEMPLOS**Ejemplo 1. Generación y caracterización de anticuerpos anti-Flt-1 de alta afinidad***Anticuerpo 01A04*

[0114] Un anticuerpo fue generado contra Flt-1 soluble usando la metodología de anticuerpo monoclonal tradicional de ratón. Brevemente, se inmunizaron ratones Balb/c con Flt-1 soluble humana recombinante (adquirida de ABCAM). El día 20 después de la inmunización, los animales fueron titulados para la producción de anti-sFlt-1 por ELISA (Figura 1). Se descubrió que un ratón era un respondedor de alto título; este animal se reforzó posteriormente con antígeno y se sacrificó 5 días después. El bazo y las células de los ganglios linfáticos de este animal se fusionaron a compañeros de mieloma de ratón para producir hibridomas. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron frente al antígeno sFlt-1, y los respondedores positivos se ampliaron y se volvieron a ensayar para unirse tanto a sFlt-1 humano como a ratón, así como a la capacidad de competir con sFlt-1 por la unión de VEGF. No hubo hibridomas de reacción cruzada que pudieran unirse a sFlt-1 humano y de ratón. Sin embargo, entre los hibridomas reactivos sFlt-1 humanos, se identificaron varios antagonistas de sFlt-1: VEGF mediante ELISA de competición (véase la Figura 2 para un experimento representativo). El más potente de estos, el compañero de fusión 01A04, se sometió a tres rondas de clonaje de células individuales para lograr el anticuerpo monoclonal 01A04. Este anticuerpo se caracterizó adicionalmente por la afinidad de unión al antígeno sFlt-1 (ELISA, BIACORE y FAC); CI50 en sFlt-1: ELISA de competición VEGF; y el rendimiento en ensayos basados en células.

Caracterización del anticuerpo 01A04 - Unión

[0115] Después de la clonación y subclonación del parental de pareja de fusión, múltiples subclones del ligando 01A04 demostraron la unión a Flt-1 soluble inmovilizado (Figura 3). Uno de estos subclones, el 01A04-02B10-02G07 monoclonal se eligió para escalamiento y banca celular basada en la unión al antígeno, la morfología del clon y la viabilidad. La constante de unión de 01A04-02B10-02G07 para el antígeno sFlt-1 se determinó mediante la metodología de resonancia de plasmón superficial (BIACORE, véase la Figura 4). El anticuerpo monoclonal 01A04-02B10-02G07 es un aglutinante sub-nanomolar para sFlt-1 humano.

Caracterización del anticuerpo 01A04: reactividad cruzada

[0116] La unión del anticuerpo monoclonal 01A04 al receptor Flt-1 expresado en células se ensayó con FACS. Se ensayaron tres líneas celulares transfectadas que expresan Flt-1 humano, de ratón o cino. La unión a las tres líneas celulares se probó incubando las células con anticuerpo durante una hora. La unión del anticuerpo a las células se reveló luego con un anticuerpo IgG PE anti-ratón. Los resultados se muestran en la Figura 5. De acuerdo con los datos de ELISA y BIACORE, el anticuerpo monoclonal 01A04 no se une a Flt-1 de ratón. Sin embargo, el anticuerpo se une a Flt-1 humano y cynomolgus expresado en las células.

Caracterización del anticuerpo 01A04 - Competencia

[0117] Para estimar la potencia de los anticuerpos, se usó el ELISA de competición (usando sFlt-1 humano y VEGF) que se puso en marcha para la selección de los Fab de llama e IgG. Se ensayó un intervalo de concentración de 10 a 0,01 µg/ml de IgG. El anticuerpo monoclonal 01A04 se ensayó frente a moléculas de control negativo (IgG de ratón policlonal purificado) y control positivo (anticuerpo monoclonal anti-sFlt-1 comercial Abcam56300). Se calcularon los valores de la mitad de la inhibición máxima (CI50). Los resultados se presentan en la Figura 6.

Caracterización del anticuerpo 01A04: Ensayo basado en células

[0118] Las células endoteliales de la vena umbilical primarias humanas (HUVEC) fueron estimuladas con VEGF en presencia o ausencia del soluble Flt-1 y el anticuerpo monoclonal 01A04. La activación de las células inducida por VEGF se ensayó determinando el estado de fosforilación del receptor VEGF R2. En presencia de Flt-1 soluble, se atenúa la activación de HUVEC inducida por VEGF. La adición del anticuerpo monoclonal 01A04 rescata la

activación celular antagonizando Flt-1 soluble (Figura 7).

Ejemplo 2. Eficacia *in vivo* del anticuerpo anti-Flt-1

5 *Administración de anticuerpo anti-Flt-1 en ratones mdx*

10 **[0119]** Ratones (n = 8) fueron inyectados con anticuerpo anti-Flt-1 (0 (PBS), 0,1 mg, o 0,5 mg, i.v.) comenzando en el día postnatal 21. El anticuerpo anti-Flt-1 fue obtenido de un comercial vendedor (Angio Proteomie, número de catálogo AP-MAB0702). Este anticuerpo es un conocido antagonista de Flt-1: VEGF. Los ratones recibieron inyecciones cada 3 días hasta el día 48. El día 53, se evaluaron los efectos *in vivo*. En un segundo grupo de experimentos, el rendimiento del anticuerpo se probó frente a un anticuerpo de control de isotipo coincidente que no se une a Flt1. Los ratones recibieron inyecciones dos veces a la semana a una dosis fija de 20 mg/kg desde el día 28 hasta el día 56. El día 57, se evaluaron los efectos *in vivo*.

15 *Histopatología*

20 **[0120]** El tratamiento con un anticuerpo anti-Flt-1 a una dosis de 0,5 mg (i.v.) mejoró significativamente la patología muscular en ratones mdx en comparación con el control del vehículo (Figuras 8, 9 y 10). Específicamente, se mejoró la integridad de la fibra muscular, según lo determinó la disminución de la acumulación de colorante azul de Evan en el músculo del diafragma (Figura 8, panel superior); la fibrosis disminuyó, según lo determinado por la tinción de Van Giesson del músculo del diafragma (Figura 8, panel inferior); y la necrosis muscular disminuyó, según lo determinó la tinción con hematoxilina y eosina (H+E) del músculo del diafragma (Figura 8, tercer panel desde la parte superior). Los núcleos ubicados centralmente (CLN) en las fibras musculares son un fenotipo típico asociado con la DMD. Una CLN más baja en el grupo tratado con anticuerpo es indicativa de la disminución del recambio de fibra y el aumento de la estabilidad de la fibra muscular (Figura 10). Se presume que el aumento de la salud muscular ocurre debido al aumento de la perfusión muscular, ya que los animales tratados con anticuerpos mostraron un mayor número de vasos sanguíneos CD31+ en el diafragma y los músculos tibiales anteriores (Figura 8, segundo panel; Figura 14). Los resultados se cuantifican en las Figuras 9, 10 y 14. La proliferación de células de vasos sanguíneos CD31+ hipotéticamente resulta de la neutralización del Flt1 soluble del antagonista de VEGF endógeno (Figura 12), lo que conduce a VEGF libre aumentado en el flujo sanguíneo de los ratones tratados (Figura 13).

Función muscular

35 **[0121]** El tratamiento con un anticuerpo anti-Flt-1 a una dosis de 0,5 mg (i.v.) mejoró significativamente la función muscular en ratones en una prueba de agarre (Figura 1, panel superior) y mostró una clara tendencia a la mejora en una prueba en cinta rodante (Figura 11, panel inferior).

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo anti-Flt-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en donde el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibe la unión de VEGF al receptor Flt-1,
- 10 2. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento se caracteriza por la capacidad de unirse a Flt-1 humana con una afinidad mayor que 10^{-9} M, opcionalmente mayor que 10^{-10} M o mayor que 10^{-12} M, en un ensayo de unión por resonancia de plasmón superficial.
- 15 3. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento para el uso de unión según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento se caracteriza por una CI_{50} por debajo de 100 pM, opcionalmente por debajo de 10 pM o por debajo de 1 pM, en un ensayo de competición con Flt-1 humana, opcionalmente en donde el ensayo de competición es la inhibición de la unión de VEGF o PLGF a Flt-1 humana.
- 20 4. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo o fragmento no se une a VEGFR2 y/o VEGFR3, opcionalmente en donde el anticuerpo o fragmento (i) no se une a un Flt-1 de ratón o de mono, o (ii) se une a un Flt-1 de ratón y/o mono.
- 25 5. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo o fragmento se selecciona del grupo que consiste en IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, ScFvs, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, opcionalmente en los que el anticuerpo o fragmento es IgG, por ejemplo, IgG1, y/o un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 30 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo monoclonal humanizado contiene una región Fc humana, opcionalmente en la que la región Fc contiene una o más mutaciones que potencian la afinidad de unión entre la región Fc y el receptor FcRn de forma tal que la semivida *in vivo* del anticuerpo se prolonga, opcionalmente en donde la región Fc contiene una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433, y/o Asn 434 de IgG1 humana.
- 35 7. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo o fragmento se administra por vía parenteral, opcionalmente en donde la administración parenteral se selecciona de la administración intravenosa, intradérmica, intratecal, inhalatoria, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea y/o transmucosa.
- 40 8. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo o fragmento se administra bimensualmente, mensualmente, trisemanalmente, quincenalmente, semanalmente, diariamente o a intervalos variables.
- 45 9. El anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo o fragmento se administra a (i) uno o más músculos esqueléticos seleccionados de la Tabla 1, y/o (ii) uno o más tejidos diana seleccionados entre diafragma, tríceps, sóleo, tibial anterior, gastrocnemio, extensor largo de los dedos, recto abdominal y/o cuádriceps, y/o (iii) el corazón.
- 50 10. Anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración del anticuerpo o fragmento da como resultado (i) regeneración muscular, reducción de fibrosis, estabilidad incrementada, fuerza muscular incrementada, flexibilidad aumentada., aumento del rango de movimiento, aumento de la resistencia, reducción de la fatigabilidad, aumento del flujo sanguíneo, mejora cognitiva, mejora de la función pulmonar e/o inhibición de la inflamación, y/o (ii) reducción de la intensidad, gravedad o frecuencia o retraso en la aparición de al menos un síntoma o característica de DMD, opcionalmente en donde al menos un síntoma o característica de DMD se selecciona del grupo que consiste en desgaste muscular, debilidad muscular, fragilidad muscular, hipertrofia muscular, pseudohipertrofia muscular, contractura articular, deformación esquelética, miocardiopatía, alteración de la ingestión, alteración de la función del intestino y la vejiga, isquemia muscular, deterioro cognitivo, disfunción del comportamiento, deterioro de la socialización, escoliosis, y función respiratoria deteriorada.
- 55
- 60
- 65

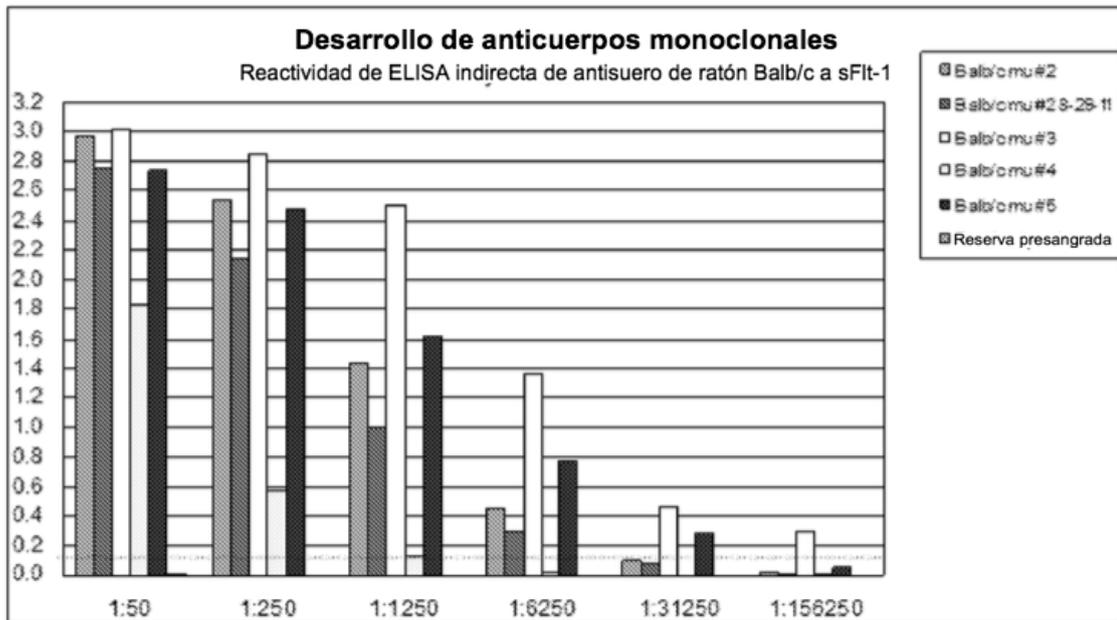


Figura 1

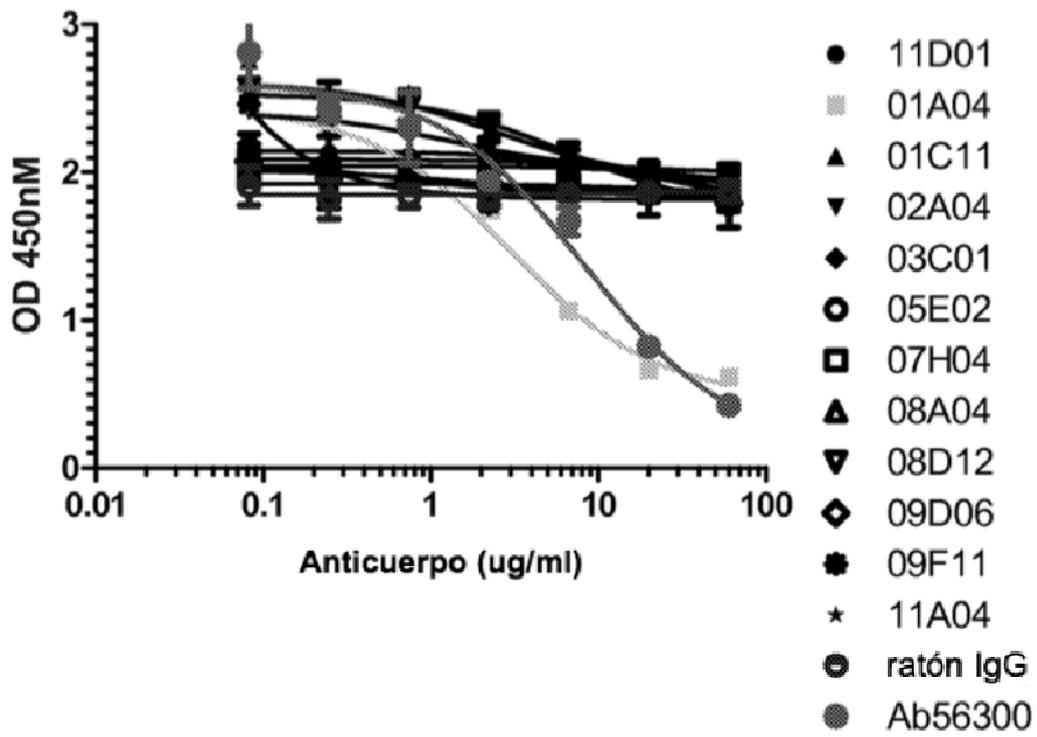


Figura 2

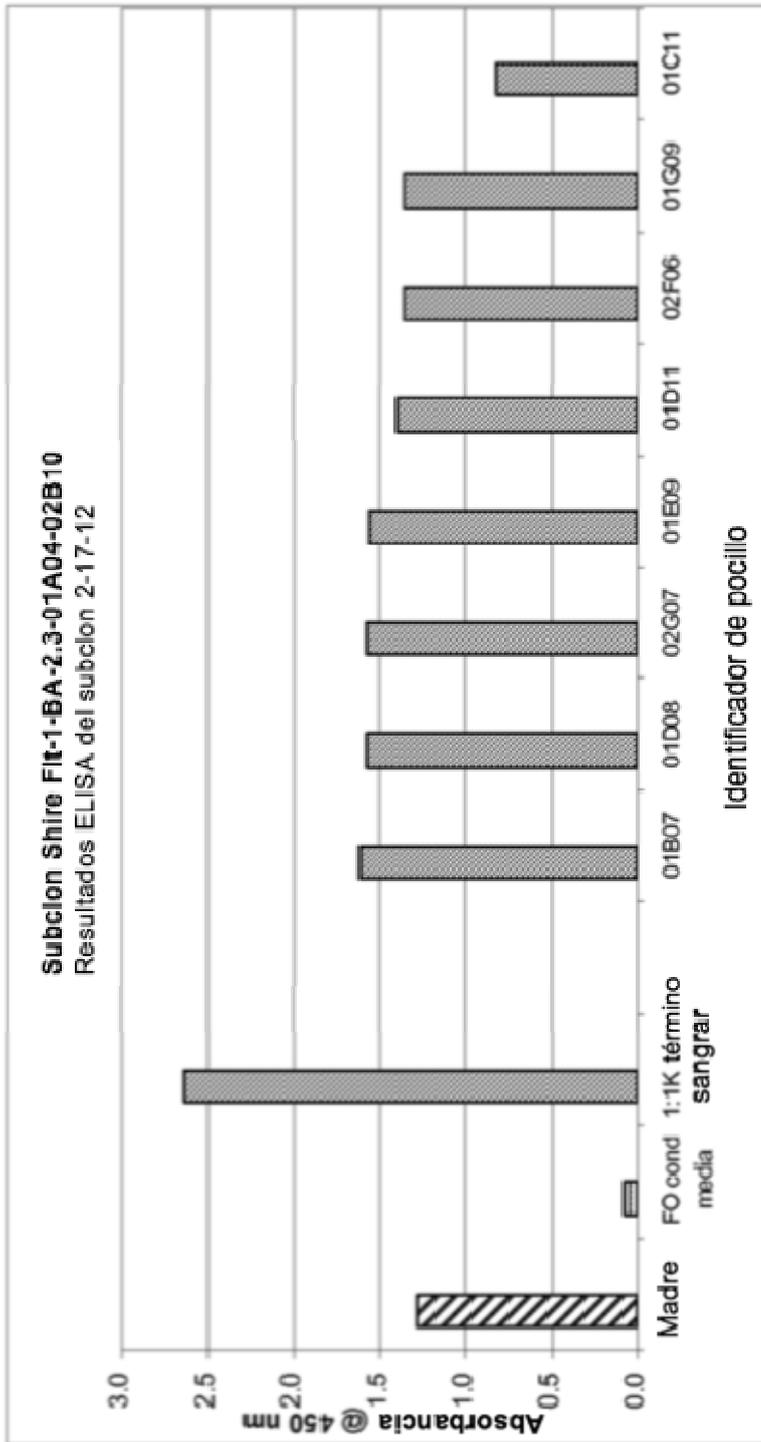
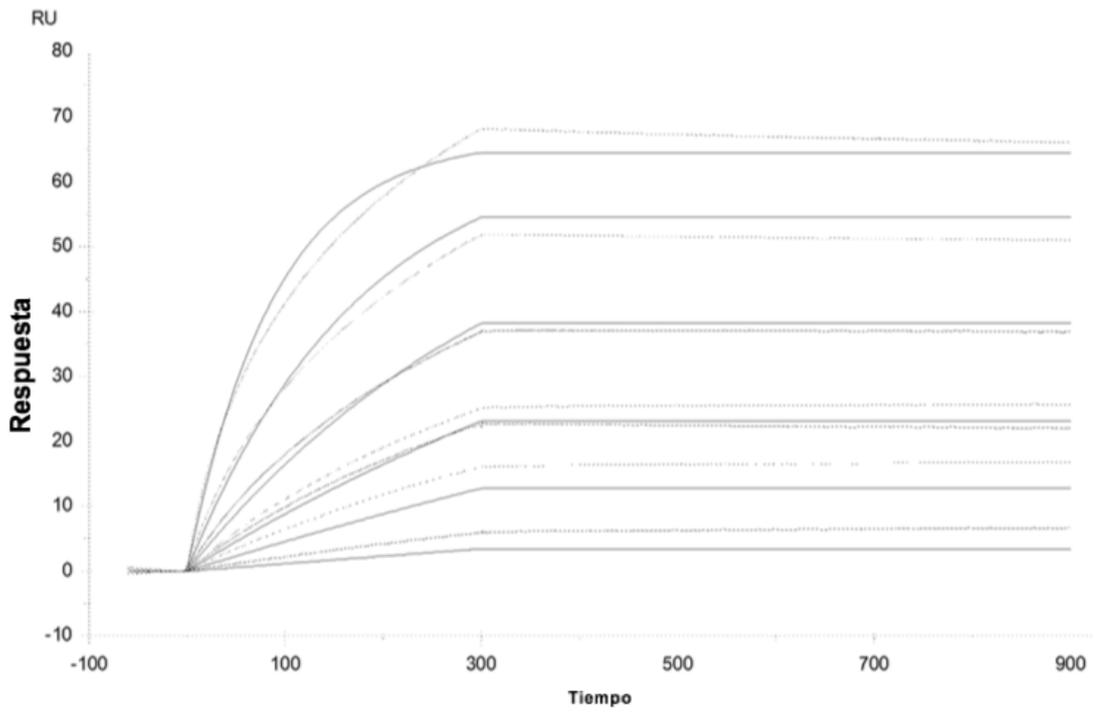


Figura 3



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	tc	Chi ² (RU ²)
3.785E+5	6.516E-7	1.722E-12	66.70	1.307E+10	5.44

Figura 4

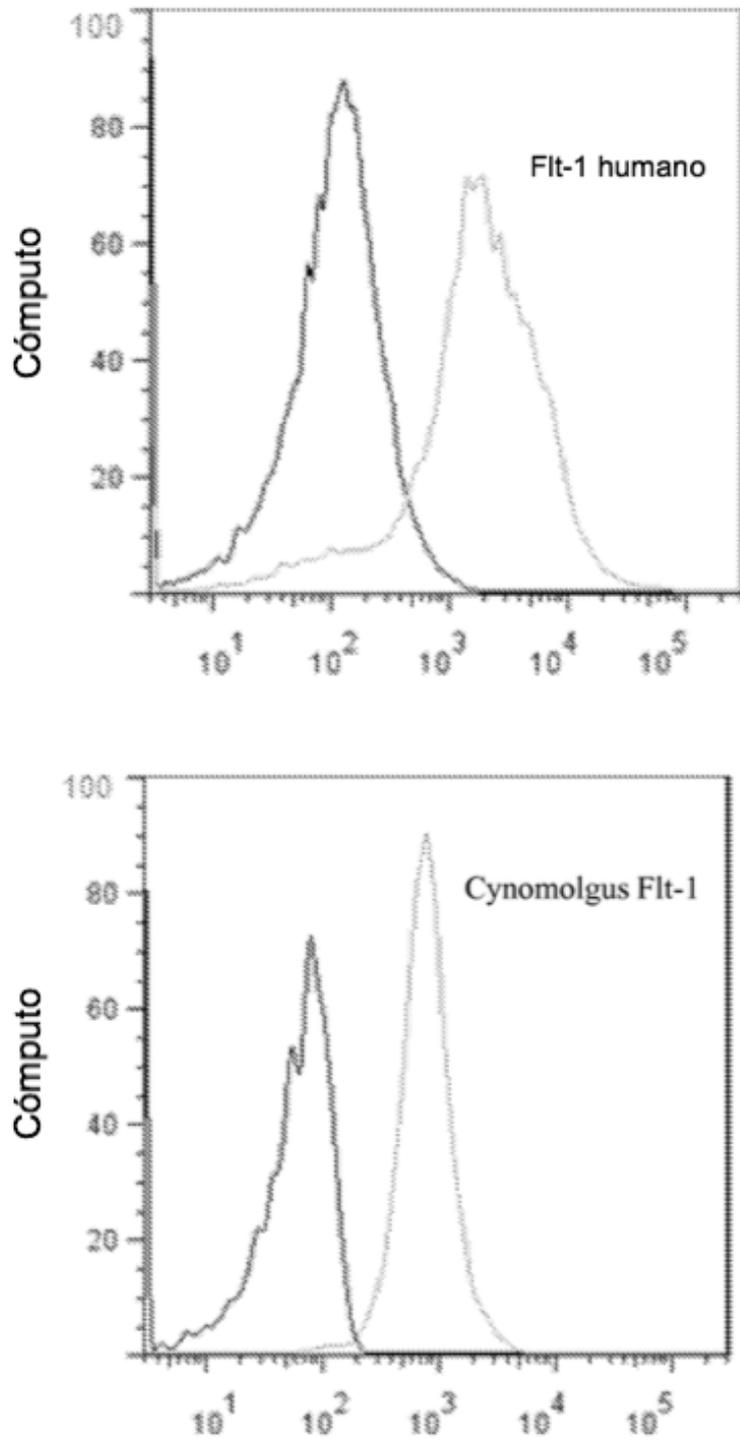


Figura 5

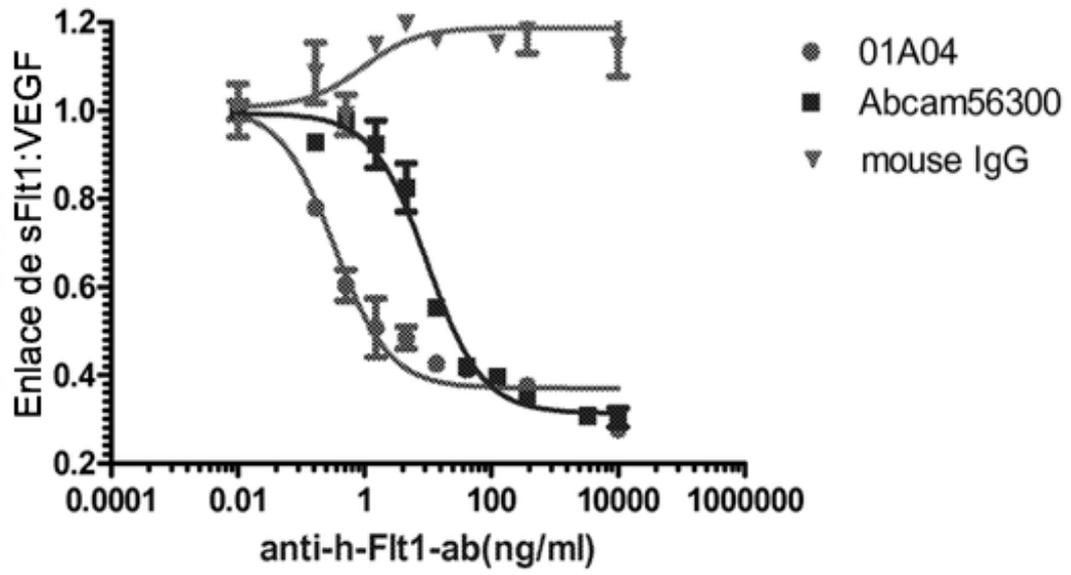


Figura 6

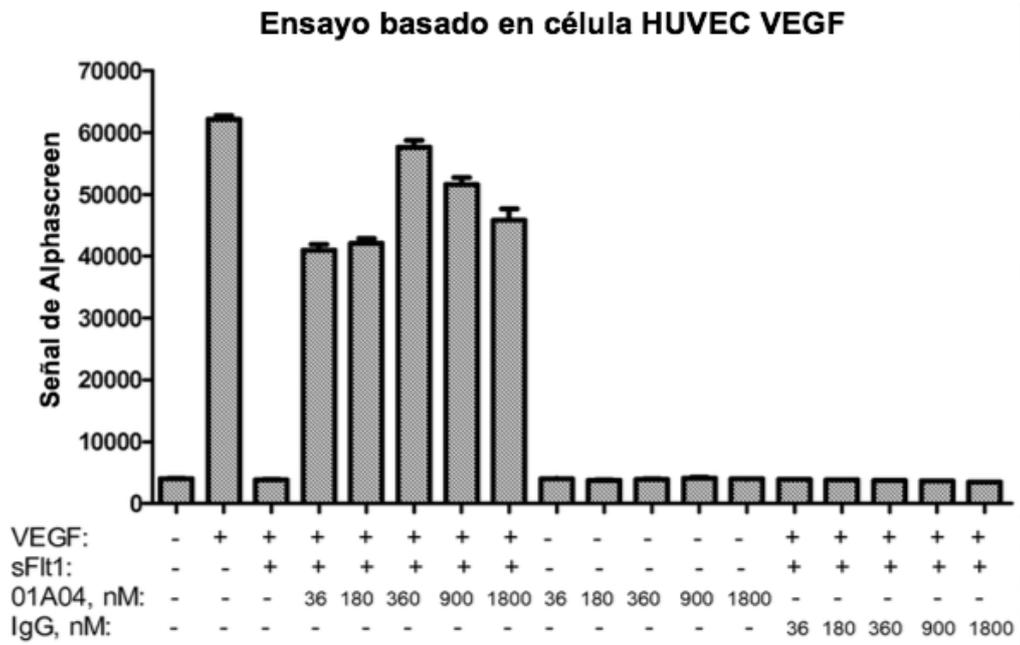


Figura 7

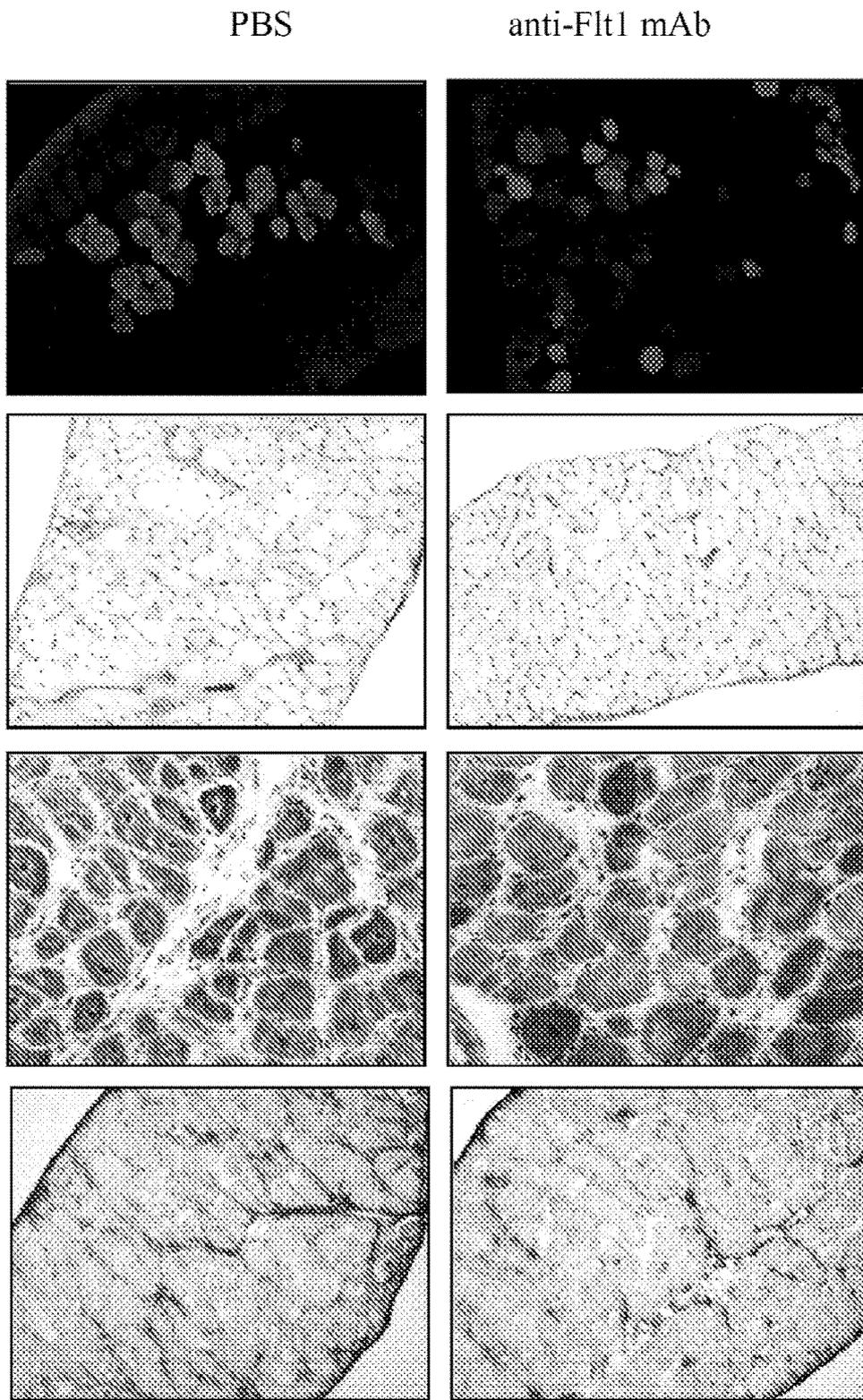


Figura 8

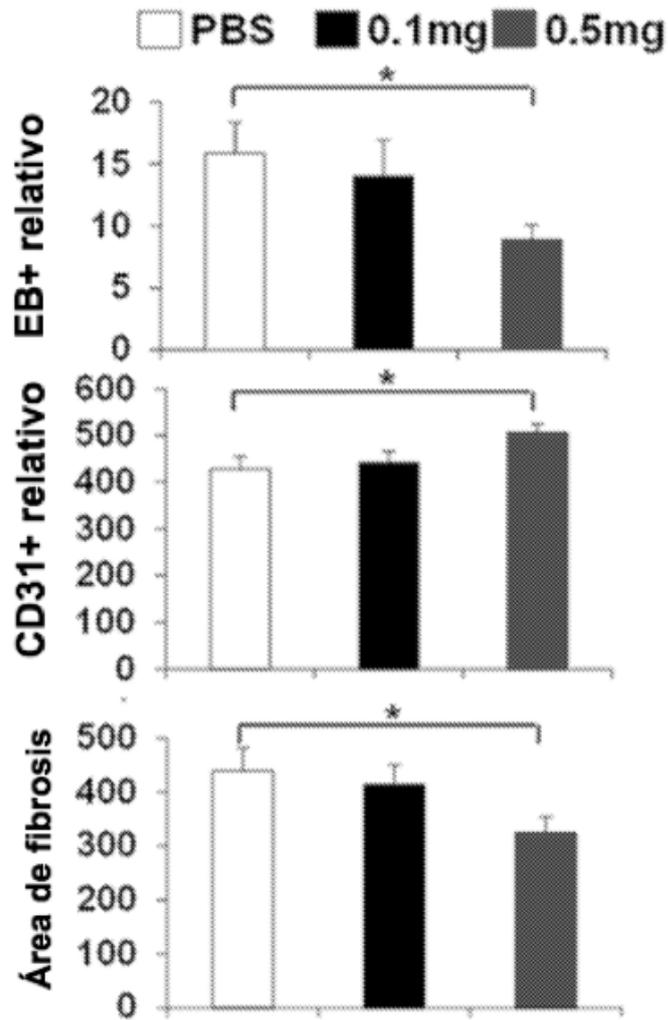


Figura 9

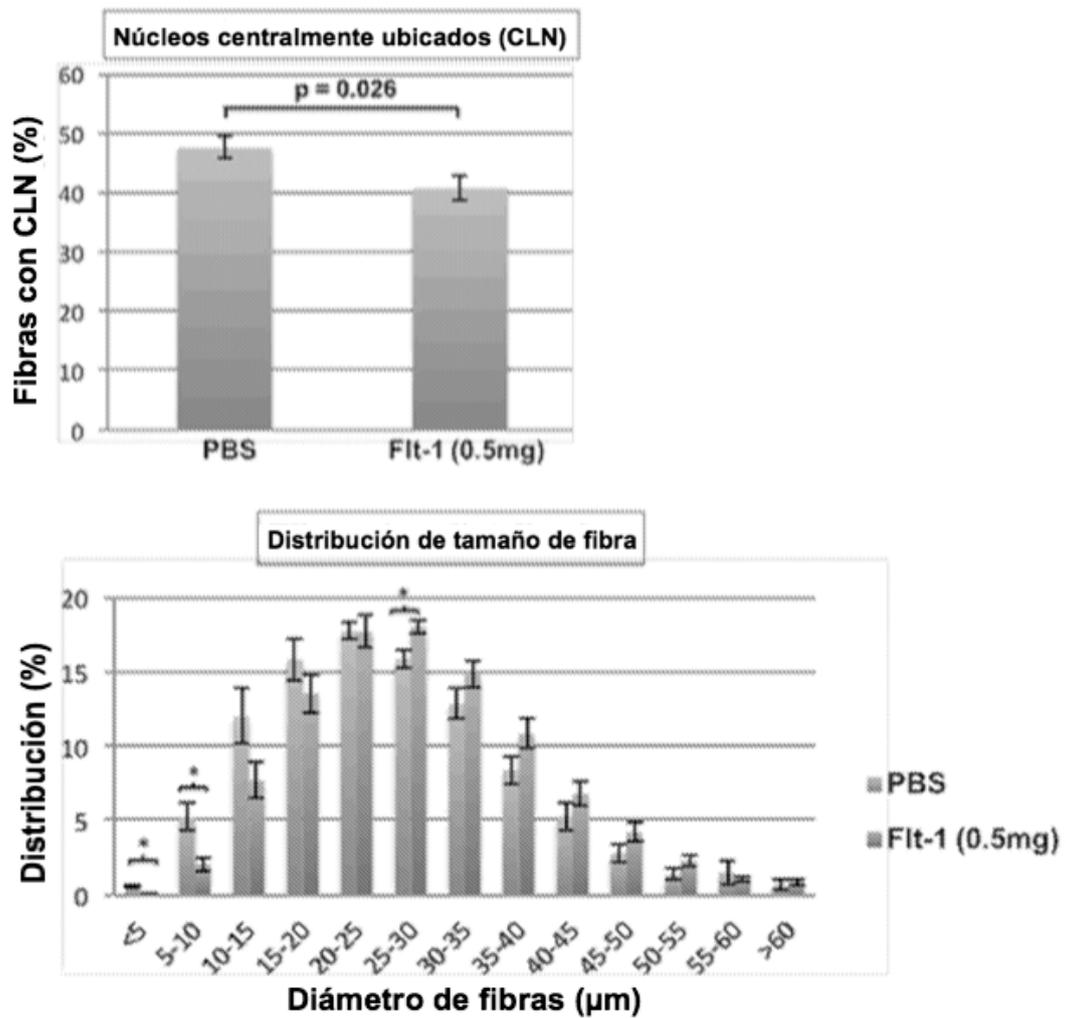


Figura 10

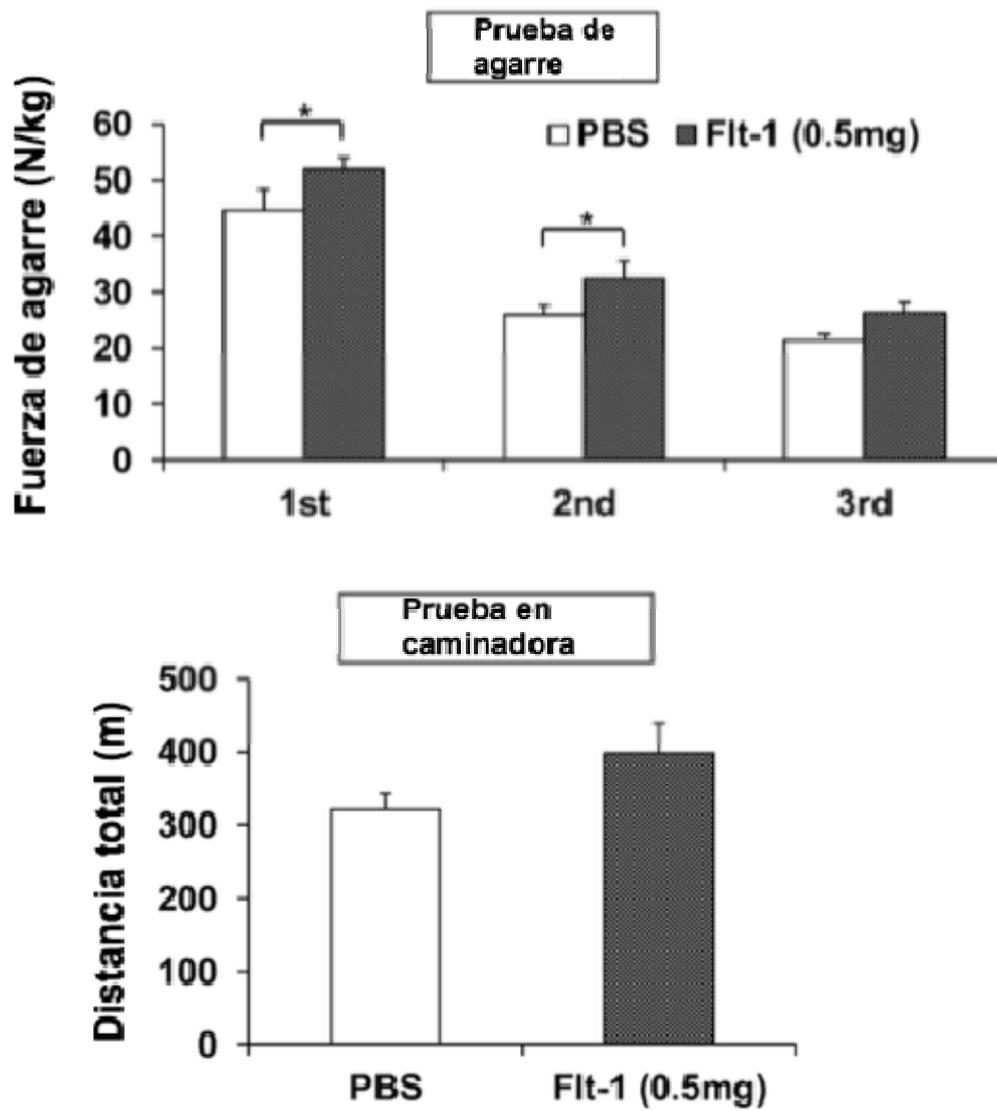


Figura 11

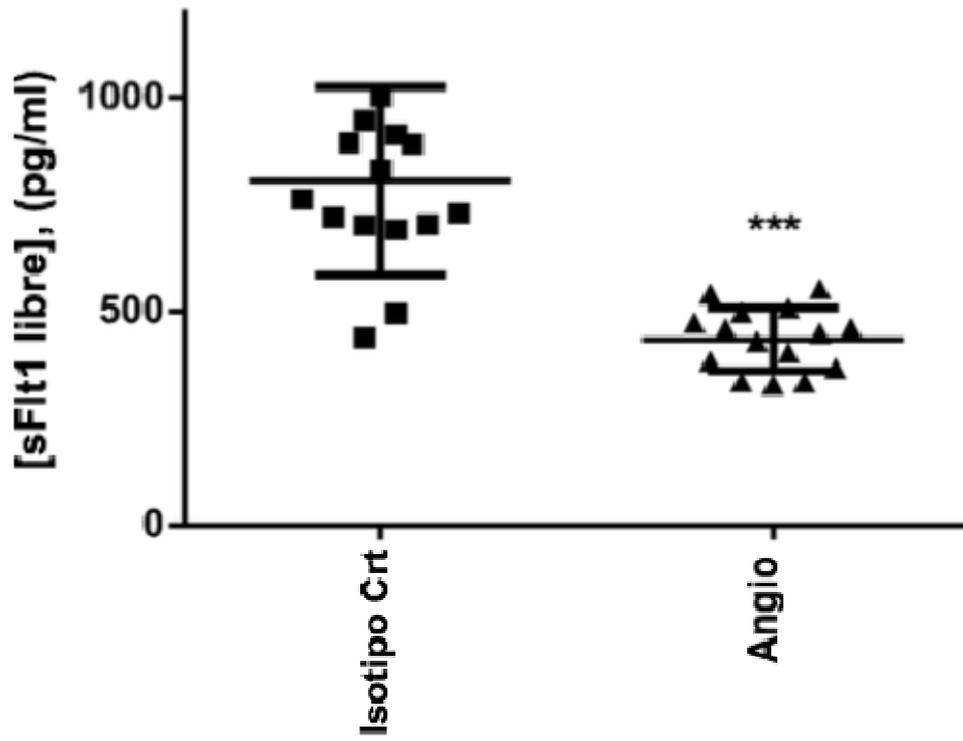


Figura 12

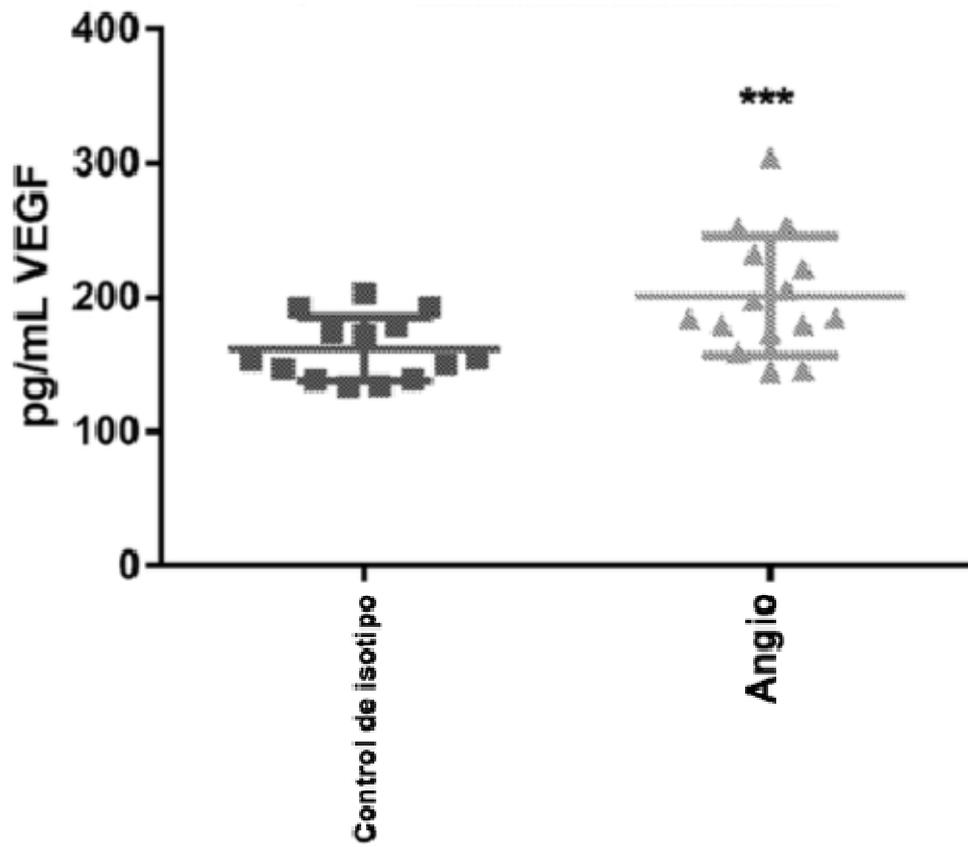


Figura 13

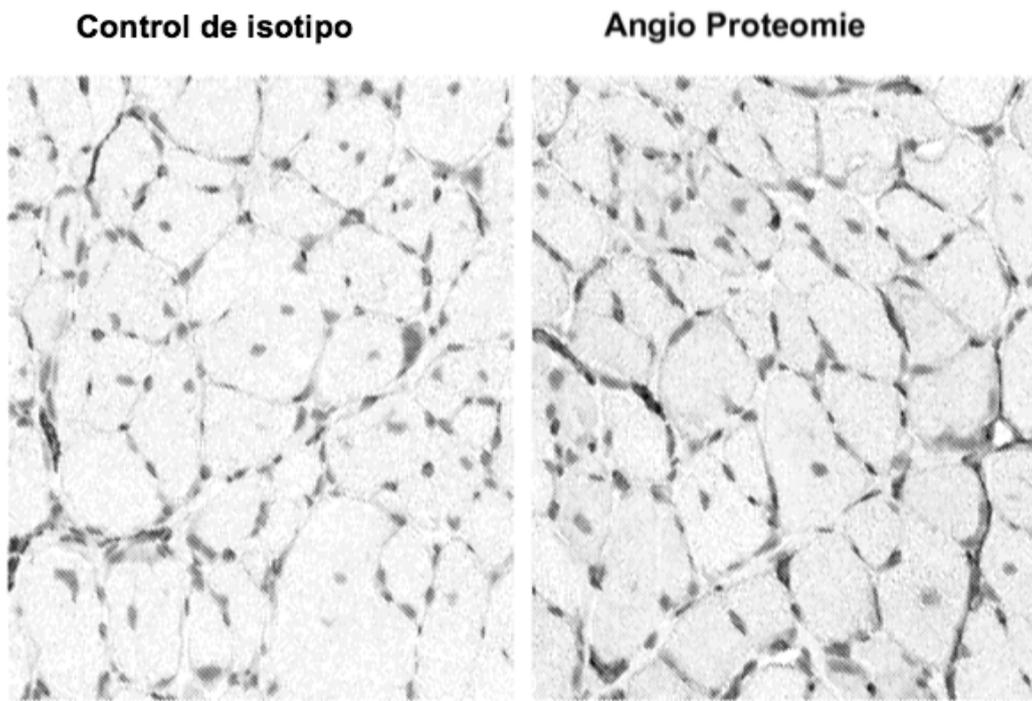


Figura 14