

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 084**

51 Int. Cl.:

C07K 14/515 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013** **PCT/CN2013/086542**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014** **WO14090053**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013** **E 13863651 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** **EP 2933266**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal para antagonizar e inhibir la unión de factor de crecimiento celular endotelial vascular y su receptor, y secuencia de codificación y uso de este**

30 Prioridad:

14.12.2012 CN 201210543652

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2019

73 Titular/es:

SUZHOU STAINWEI BIOTECH INC. (100.0%)
Suite A105, A3 Building Biobay-Park South
No.218 Xing-Hu Rd. Suzhou Industry Park
Jiangsu 215125, CN

72 Inventor/es:

LUO, SHIPING;
HU, HONGQUN;
CHEN, ZUI;
CAI, MINGWEN;
SUN, YANAN;
LIU, HAIYUN;
ZHOU, JIANYING;
SONG, XIAOQI;
PING, XIAOYA;
CHEN, SIYU;
SHI, DONGHONG;
XU, YIQING y
ZHOU, QUNMIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 719 084 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal para antagonizar e inhibir la unión de factor de crecimiento celular endotelial vascular y su receptor, y secuencia de codificación y uso de este.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología que incluye inhibición de la unión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a su receptor (VEGF-R) así como también sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

En biología, la angiogénesis se refiere a un proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos mediante surgimiento o división a partir de los vasos sanguíneos existentes (capilares, pequeñas arterias y venas) en el organismo. La angiogénesis resulta beneficiosa y esencial para mantener muchos procesos fisiológicos normales, tal como desarrollo embrionario, cicatrización, y reparación. Por otro lado, la proliferación de vasos sanguíneos o angiogénesis excesiva se asocia también con procesos patológicos, tal como crecimiento tumoral, metástasis e inflamación. La razón clave para la proliferación *in vivo* de los vasos sanguíneos se debe a la capacidad de células endoteliales para dividirse y proliferar de manera incisiva y para insertarse en la pared vascular existente. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) resulta el factor angiogénico más importante y más potente responsable del crecimiento celular endotelial vascular. La importancia del VEGF en angiogénesis ha sido bien demostrado mediante estudios en ratones con VEGF bloqueado: los embriones de ratón que llevaban una copia del gen de VEGF, mientras que la otra fue bloqueada, morirían a los 11 o 12 días de desarrollo debido a una reducción y anomalía en la angiogénesis vascular (Carmeliet P et. al., Nature 1996, 380:435; Ferrara N et. al., Nature 1996, 380:439).

La sobreexpresión de VEGF se ha observado en una variedad de neoplasias, tales como cánceres colorrectal, estomacal, ovárico, mamario, carcinoma hepatocelular y mieloma múltiple; el nivel de expresión de VEGF se encuentra altamente correlacionado con el crecimiento tumoral, recurrencia y metástasis (Dvorak HF et. al.: J Exp Med 1991; 174:1275-8; Brown LF et. al., Cancer Res 1993; 53:4727-35; Weidner N, Semple JP, Welch WR y Folkman J: N Engl J Med 1991; 324:1-8.4-5). En los últimos años, los datos acumulados a partir de unas series de experimentos en animales han mostrado que el bloqueo de angiogénesis mediante la inhibición de la interacción de VEGF y VEGF-R, mediante manipulación de genes o administración de fármacos, conduce a isquemia tumoral y necrosis, lo que da como resultado, a su vez, inhibición de crecimiento tumoral, metástasis y, en última instancia, prolongación de la supervivencia en general. Por lo tanto, el desarrollo de fármacos dirigidos a la angiogénesis mediada por VEGF se ha convertido en un área de investigación nueva a nivel mundial.

Actualmente, existen dos enfoques principales al desarrollo de fármacos antiangiogénicos que se dirigen a las trayectorias de VEGF y VEGF-R.

El primer enfoque incluye un inhibidor que se opone a la quinasa tirosina que se ubica en el dominio intracelular del receptor de VEGF (VEGF-R). Tales inhibidores antagonistas son, de manera general, fármacos químicos de moléculas pequeñas, los fármacos prototípicos incluyen Sutent (Sunitib), que se desarrolló y se comercializó en el mercado en 2006 por Pfizer, y Nexavar (Sorafenib), que se desarrolló y se comercializó por Bayer (Alemania) y Onyx Pharmaceuticals.

El segundo enfoque incluye moléculas de proteína grandes, ya sea un anticuerpo o una proteína de fusión que emplea el receptor Fc de un anticuerpo, que puede bloquear directamente la unión de VEGF con respecto a su receptor (VEGF-R). Un fármaco que se desarrolló mediante este enfoque es Avastin (Bevacizumab), un fármaco de anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF que se desarrolló y se produjo por Roche/Genentech y obtuvo la aprobación de la FDA en febrero de 2004. Avastin constituye hasta el momento el único anticuerpo monoclonal anti-VEGF disponible en el mercado mundial. Avastin, mediante unión altamente específica a VEGF, impide que el VEGF se una a VEGF-R, y bloquea, de este modo, la angiogénesis e inhibe la proliferación tumoral (Presta LG et. al., Cancer Res, 1997, 57: 4593; Hurwitz H et. al., N Engl J Med, 2004; 350:2335). Avastin se ha aprobado actualmente por la FDA para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico (mCRC), cáncer de pulmón avanzado de células no pequeñas no escamosas (NSCLC), glioblastoma, carcinoma de células renales metastásico (mRCC), y otros tumores sólidos diversos. Avastin recibió también la aprobación de la SFDA de China en febrero de 2010 para el tratamiento de cáncer de colon. El documento WO 2011/159704 se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen a VEGF para bloquear la unión de VEGF a sus receptores e impedir la fosforilación de VEGFR2. El documento US 2010/260668 se refiere a proteínas de unión multivalentes y multispecíficas diseñadas, métodos para prepararlas y a sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad.

El precursor de Avastin puede remontarse a un anticuerpo monoclonal de ratón, A4.6.1. El origen de este anticuerpo, las líneas celulares de hibridoma que lo secretan, y su uso se describen en las siguientes patentes: patente US nro. 6,582,959 (inventor: Kim, Kyung Jin; fecha de patente: 24 de junio, 2003; título de patente: Anticuerpos para Factor de Crecimiento Endotelial Vascular); y la patente US nro. 7,227,004 (inventor: Kim, Kyung Jin; fecha de patente: 5 de junio, 2007; título de patente: Anticuerpos para Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). La secuencia de aminoácidos de este anticuerpo murino y su versión humanizada, rhuMab-VEGF (a saber, Avastin) fue publicada (Presta LG et. al., Cancer Res, 1997, 57: 4593). El método de preparación se divulgó en la patente US nro. 6,054,297

(inventores: Carter; Paul J. y Presta; Leonard G; fecha de solicitud de patente: 9 de mayo, 1995; fecha de patente: 25 de abril, 2000; título de patente: Anticuerpos Humanizados y Métodos para Prepararlos).

Sin embargo, este anticuerpo tiene todavía las siguientes desventajas:

5 1) Resulta similar a la mayoría de otros anticuerpos monoclonales, el anticuerpo monoclonal A4.6.1 (o Avastin) puede unirse solamente a una parte de la región de VEGF o epítipo, pero no puede unirse a otros epítopos o cubrir otras áreas del antígeno de VEGF.

2) Experimentos previos en animales e investigación clínica reciente han mostrado que la administración de solo A4.6.1 o Avastin no resultó efectiva para neutralizar el VEGF en su totalidad, o inhibir por completo la angiogénesis
10 mediada por VEGF in vivo.

Por lo tanto, resulta importante y necesario desarrollar nuevos anticuerpos monoclonales o agentes terapéuticos que tienen la capacidad de unirse a VEGF en nuevos sitios de unión y que pueden, al mismo tiempo, inhibir la unión de VEGF a VEGF-R.

Resumen de la invención

15 Un problema técnico para resolver mediante la presente invención consiste en proporcionar un anticuerpo o derivado de anticuerpo que puede inhibir la unión de VEGF a VEGF-R. La definición del anticuerpo en esta invención incluye un anticuerpo o derivado de anticuerpo humanizado, tal como un fragmento Fab del anticuerpo y un anticuerpo de cadena única.

Otro problema técnico para resolver mediante la presente invención consiste en proporcionar una molécula de ADN o gen que codifica el anticuerpo anterior.

Otro problema técnico para resolver mediante la presente invención consiste en proporcionar una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anterior.

Otro problema técnico para resolver mediante la presente invención consiste en proporcionar un método para preparar el anticuerpo anterior.

25 Con el fin de resolver los problemas técnicos anteriores, la presente invención proporciona, en un aspecto, un anticuerpo monoclonal murino que inhibe la unión de VEGF a VEGF-R. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de este anticuerpo se muestra en la SEQ ID NO:1, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO:2. El anticuerpo monoclonal murino se derivó a partir de la línea celular de hibridoma de ratón PV19-5, que se ha depositado en el Common Microorganism Center de la China Microbial Culture Preservation Commission desde el 12 de marzo, 2012 (número de ingreso: CGMCC No. 5889; Lugar de ingreso: Beijing, R. P. China). De manera adicional, la presente invención proporciona, además, moléculas de ADN que codifican el anticuerpo monoclonal murino anterior, la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera se muestra en el SEQ ID NO:3 y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO:4.

35 La presente invención proporciona, en un segundo aspecto, un anticuerpo monoclonal humanizado que deriva a partir del anticuerpo monoclonal murino anterior. En comparación con el anticuerpo monoclonal murino, el anticuerpo monoclonal humanizado, como un fármaco terapéutico, tiene ventajas de un período de vida media largo de hasta 20 días e inmunogenicidad baja en el organismo humano, siendo, de modo, adecuado para uso a largo plazo o repetido. En la presente invención, la secuencia de proteína en tanto la región variable de cadena pesada como la región
40 variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino anterior fue humanizada por completo, lo que incluye las sustituciones de aminoácidos en la región marco, en los sitios vecinos a la región de unión a antígeno/región determinante de la complementariedad. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO:5 y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO:6. De manera adicional, la presente invención proporciona, además, una secuencia de ADN que codifica
45 las regiones variables de este anticuerpo monoclonal humanizado, con la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO:7 y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la SEQ ID NO:8.

La presente invención proporciona, en un tercer aspecto, un derivado del anticuerpo monoclonal humanizado anterior, con la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de antígeno de cadena ligera (CDR-L) que se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, y la secuencia de aminoácidos de la
50 región determinante de la complementariedad de antígeno de cadena pesada (CDR-H) que se muestra en la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:14.

La presente invención proporciona, en un cuarto aspecto, un vector de expresión, que contiene una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monoclonal humanizado anterior y una secuencia operativa necesaria para la expresión del
55 gen anterior.

La presente invención proporciona, en un quinto aspecto, una línea celular huésped que se transfectaron con el vector de expresión recombinante anterior. Tanto esta línea celular huésped como sus células hijas expresan el anticuerpo monoclonal humanizado anterior.

- 5 El término “anticuerpo monoclonal (mAb)” que se usa en la presente se refiere a una inmunoglobulina que se obtiene a partir de una célula clonal, que tiene la misma estructura y características químicas y es específica para un determinante antigénico único. El anticuerpo monoclonal resulta diferente con respecto a una preparación de anticuerpo policlonal convencional (que tiene normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes), con cada anticuerpo monoclonal dirigido contra el mismo determinante en el antígeno. De manera
10 adicional a su especificidad, el anticuerpo monoclonal resulta además ventajoso en cuanto a que se cultiva a partir de hibridomas o células de ingeniería recombinante, y que no se mezclarán con otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica que las propiedades del anticuerpo se alcanzan a partir de una población homogénea de anticuerpos, lo que no debería interpretarse como que se necesita usar cualquier método en particular para la producción de anticuerpos.
- 15 El término “anticuerpo monoclonal humanizado” que se usa en la presente se refiere a que las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas se sustituyen por todas o la mayoría de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos monoclonales murinos (incluyendo la secuencia de región marco en la región variable), a excepción de la región determinante de la complementariedad (CDR), de manera que se minimiza la inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal murino.
- 20 Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” que se usan en la presente se refieren a un isotetraproteoglicano de alrededor de 150.000 Daltons que tiene las mismas características estructurales, que se compone de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada una de las cadenas ligeras se encuentra ligada con la cadena pesada a través de un enlace disulfuro covalente, teniendo las cadenas pesadas de isotipos de las diferentes inmunoglobulinas diferente cantidad de enlaces disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras tienen además
25 enlaces disulfuro de intracadena que se separan de manera regular. Cada una de las cadenas pesadas es provista en un extremo con una región variable (VH) y, a continuación de la cual existe un número de regiones invariables. Cada una de las cadenas ligeras es provista en un extremo con una región variable (VL), y, en el otro extremo, con una región invariable; la región invariable de la cadena ligera resulta opuesta con respecto a la primera región invariable de la cadena pesada, y la región variable de la cadena ligera resulta opuesta con respecto a la región variable de la cadena pesada. Residuos de aminoácidos especiales forman una interfaz entre las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

- El término “variable” que se usa en la presente indica que algunas porciones de la región variable en un anticuerpo son diferentes en cuanto a la secuencia, lo que da como resultado la unión de diversos anticuerpos específicos a antígenos particulares de estos así como también la especificidad. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye
35 uniformemente a través de la región variable de anticuerpo, sino que se concentra en tres segmentos en la región determinante de la complementariedad (CDR) o región hipervariable en las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada. La parte más conservadora en la región variable se denomina la región marco (FR). Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo incluyen cada una cuatro regiones FR, que se encuentran sustancialmente en una configuración β -colapsada y se conectan con tres CDRs formando el bucle conector, con una
40 estructura β -colapsada de manera parcial que resulta posible de formarse en algunos casos. Las CDRs en cada cadena se encuentran próximas unas con respecto a las otras a través de la región FR y forman el sitio de unión al antígeno de anticuerpo en conjunto con la CDR de otra cadena (véase Kabat et. al., NIH Publ. Nro. 91 3242, Vol. 1, pp. 647-669 (1991)). La región invariable de anticuerpo no participa de manera directa en la unión del anticuerpo al antígeno pero exhibe efectos y funciones diferentes, tales como la participación en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad mediada por complemento (CDC) del anticuerpo.

El anticuerpo de la presente invención puede prepararse comúnmente mediante el siguiente método.

En primer lugar, se inserta el gen que codifica el anticuerpo de la presente invención en el vector de expresión que contiene la secuencia reguladora de expresión adecuada.

- El término “secuencia reguladora de expresión” que se usa en la presente se refiere comúnmente a una secuencia que participa en el control de la expresión génica. La secuencia reguladora de expresión incluye un promotor que se puede operar ligado al gen diana así como también a una señal de terminación. La secuencia génica (ADN) del anticuerpo de la presente invención puede codificarse mediante los medios convencionales que se conocen bien por aquellos expertos en la técnica, tal como síntesis artificial de acuerdo con la secuencia de proteína desbloqueada mediante la presente invención o la amplificación mediante PCR. Después, el fragmento de ADN que se obtiene
55 mediante la síntesis o amplificación mediante PCR puede insertarse en un vector de expresión adecuado mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica. El vector de expresión que se usa en la presente invención puede ser un vector de expresión disponible en el mercado que se conoce por aquellos expertos en la técnica, tal como el vector de expresión pCDNA3.1 de Invitrogen.

- Las células huésped adecuadas para aceptación de la transformación del vector de expresión incluyen, de manera general, tanto procariotas como eucariotas. Entre los ejemplos de células huésped procarióticas que se usan

comúnmente se incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*. Células huésped eucarióticas que se usan comúnmente incluyen levadura, insectos, y mamíferos. En la presente invención, las células huésped preferidas son células de mamíferos, particularmente células de ovario de hámster chino (CHO).

5 Las células huésped transfectadas mediante el vector de expresión se cultivan en condiciones adecuadas (por ejemplo, las células huésped se cultivan con un medio libre de suero en un matraz de cultivo celular o biorreactor mediante adhesión a la pared o suspensión), se recolecta el sobrenadante y luego se purifica mediante etapas de separación convencionales, incluyendo cromatografía de afinidad por proteína A, cromatografía de intercambio iónico, filtración para producir los anticuerpos de la presente invención.

10 Los anticuerpos de la presente invención que se obtienen mediante purificación pueden disolverse en un solvente apropiado tal como PBS permitiendo que la concentración final conveniente sea de entre 0,1 mg/ml y 100 mg/ml.

La presente invención proporciona, en un sexto aspecto, una composición farmacéutica que contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal humanizado o del derivado de este según se describe en la presente invención y el vector farmacéuticamente aceptable.

15 El término "farmacéuticamente aceptable" que se usa en la presente se refiere a que cuando este anticuerpo y composición se administran de manera apropiada a un animal o a un humano, no producirán una alergia u otra reacción adversa. El "vector farmacéuticamente aceptable" que se usa en la presente debería ser compatible con la proteína de anticuerpo de la presente invención, a saber, ser capaz de mezclarse con esta sin reducción significativa del efecto de la composición farmacéutica. Entre los ejemplos específicos de algunas sustancias que pueden usarse
20 como el vector farmacéuticamente aceptable o el ingrediente de este se incluyen las siguientes sustancias: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sucrosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de cacao; alcoholes polihídricos, tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes, tales como Tween; estabilizadores; antioxidantes; agua estéril apirógena para inyección;
25 solución salina; regulador de fosfato.

La composición farmacéutica de la presente invención puede constituirse en diversas formas según se requiere, tales como polvo liofilizado, inyección, gotas para los ojos y otros medicamentos, determinando el médico la dosis que resulta beneficiosa para el paciente de acuerdo con el tipo, edad, peso, y condición general de la enfermedad, manera de administración, y otros factores del paciente.

30 La presente invención, en un séptimo aspecto, proporciona la composición farmacéutica anterior para tratamiento de enfermedades que se asocian con angiogénesis. En los ejemplos específicos de la presente invención, se describe la aplicación del anticuerpo humanizado in vivo para inhibición de tumores múltiples trasplantados tales como cáncer de colon, cáncer de mama y rhabdomyosarcoma en humanos.

La presente invención, en un octavo aspecto, proporciona un método para preparar el anticuerpo monoclonal humanizado anterior, que incluye las siguientes etapas:

- 35 a) Proporcionar un vector de expresión, que contiene una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monoclonal humanizado anterior y una secuencia reguladora de expresión que se liga a esta secuencia;
- b) transformar la célula huésped con el vector de expresión de la Etapa a);
- c) cultivar la célula huésped de la Etapa b) en condiciones adecuadas para expresión del anticuerpo monoclonal humanizado; y
40 d) separar, purificar y recolectar el anticuerpo monoclonal humanizado a partir de sobrenadantes de cultivo de célula huésped.

Con el fin de obtener el anticuerpo monoclonal que inhibe la unión de la proteína humana VEGF al receptor de esta (VEGF-R) así como también la línea celular de hibridoma que secreta este anticuerpo, en la presente invención se
45 elige usar proteína humana recombinante VEGF165 que se expresa en levaduras como antígeno y se inmunizaron ratones mediante pequeñas dosis de inyecciones subcutáneas repetidas hasta que se alcanzaron titulaciones altas de producción de anticuerpo policlonal anti-VEGF. Luego se obtuvieron células esplénicas a partir de ratones seleccionados y se fusionaron con una línea celular de mieloma de ratón. Se obtuvieron un número de líneas celulares de hibridoma con secreción positiva de anticuerpos anti-VEGF humano. Se demostró que un clon de hibridoma,
50 codificado PV19, secretaba anticuerpos capaces de reconocimiento específico y de una alta afinidad de unión al VEGF humano (incluyendo VEGF121, 165, VEGF189 y etc) cuando se estudiaron mediante ELISA, Western blot, inmunohistoquímica y otros métodos.

Los experimentos *in vitro* demostraron que este anticuerpo monoclonal murino inhibe efectivamente la unión de VEGF a VEGF-R. En el modelo de xenoinjerto *in-vivo* donde las líneas celulares de tumor humano se trasplantaron a un
55 desnudo, este anticuerpo monoclonal murino demostró inhibición de crecimiento tumoral de cáncer de mama, rhabdomyosarcoma y muchos otros.

La presente invención proporciona el gen que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera después de separación de proteína, purificación, ingeniería genética y otros medios. Además, la presente invención completa la humanización de este anticuerpo sobre la base anterior. El fragmento de ADN que codifica el anticuerpo humanizado se insertó en el vector de expresión (pCDNA3.1), y se transfirió a células de ovario de hámster chino (CHO) para obtener líneas celulares huéspedes recombinantes. El anticuerpo humanizado puro PV19, con la actividad biológica de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* se obtuvo a partir del medio de cultivo celular mediante purificación. Este anticuerpo humanizado puede usarse como un componente farmacéutico, o prepararse como una formulación farmacéutica adecuada, que se usa de manera única o en combinación con fármacos quimioterapéuticos y otras terapias, para tratamiento en un amplio espectro de diversos tumores sólidos, tales como cáncer de colon, cáncer de mama y rhabdomyosarcoma.

La presente invención divulga además el proceso de humanización de este anticuerpo, así como también la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de este anticuerpo humanizado.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra sobrenadantes a partir de la línea celular de hibridoma de ratón PV19 que se unen a proteína humana VEGF165 recubiertos en las placas (Ejemplo 1), en la que: M23 es sobrenadante a partir de una línea celular de hibridoma que se conoce que secreta anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano y sirve como un control positivo; P16, sobrenadante a partir de una línea celular de hibridoma no relacionada y que sirve como un control negativo; y SP2/0 que representa sobrenadante a partir de una línea celular de mieloma no fusionada.

La Fig. 2 muestra un análisis de gel por SDS-PAGE de proteína de anticuerpo murino PV19. El anticuerpo PV19 se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular de hibridoma PV19 mediante cromatografía de afinidad. Carril 1: anticuerpo PV19 reducido por DTT, carril 2: anticuerpo PV19 no reducido, y Marcador: marcador de peso molecular de proteína.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático representativo que muestra un resultado de ELISA competitivo (en Ejemplo 3), en la que mPV19&Biotina-VEGF es una mezcla de anticuerpo PV19 y biotina-VEGF, y W10&Biotina-VEGF es una mezcla de un anticuerpo W10 no relacionado y biotina-VEGF (sirve como un control negativo).

La Fig. 4 muestra el análisis de gel por SDS-PAGE de la proteína de anticuerpo humanizado hPV19 (en el Ejemplo 8 de la presente invención). El anticuerpo hPV19 se obtuvo a partir del sobrenadante de cultivo a través de purificación con una columna de cromatografía de afinidad. Carril 1: anticuerpo hPV19 reducido por DTT, carril 2: anticuerpo hPV19 no reducido, y Marcador: marcador de peso molecular de proteína.

La Fig. 5 es un diagrama esquemático de un resultado experimental (Ejemplo 8 de la presente invención), que muestra la unión relativa de anticuerpo humanizado (hPV19), anticuerpo quimérico (chPV19), y anticuerpo murino (mPV19) a la proteína humana VEGF165, según se mide mediante ELISA directo. ChP16, un anticuerpo quimérico no relacionado, es un control negativo.

La Fig. 6 es un diagrama esquemático de los resultados de un ELISA competitivo del Ejemplo 8 de la presente invención, que muestra el bloqueo *in-vitro* de la unión de biotina-proteína humana VEGF165 (bio-VEGF) a VEGFR1 mediante anticuerpo humanizado (hPV19), anticuerpo quimérico (chPV19), y anticuerpo murino (mPV19). W10, un anticuerpo quimérico no relacionado, es un control negativo.

La Fig. 7 es un diagrama esquemático de un resultado experimental (Ejemplo 9 de la presente invención), que muestra la unión relativa de anticuerpo humanizado hPV19 y Avastin a ya sea la proteína VEGF de tipo salvaje (VEGF165) o mutante (VEGF-688/A).

Las Figs. 8A y 8B son diagramas esquemáticos de resultados experimentales (Ejemplo 10 de la presente invención), que muestran que el anticuerpo humanizado hPV19 inhibe el crecimiento de cáncer de colon humano Ls-174-T en ratones desnudos. En las que: la Fig. 8A muestra una tendencia relativa de crecimiento de volumen tumoral; y la Fig. 8B muestra la tasa media de reducción de peso de tumor de los grupos de tratamiento respectivos (% de tasa de inhibición de peso tumoral) en comparación con el grupo de control negativo al final del experimento.

Las Figs. 9A y 9B son diagramas esquemáticos de resultados experimentales (Ejemplo 11 de la presente invención), que muestran que el anticuerpo humanizado hPV19 inhibe el crecimiento de cáncer de mama humano MD231-MBA en ratones desnudos. En las que: la Fig. 9A muestra una tendencia relativa de crecimiento de volumen tumoral de los grupos respectivos durante el experimento; y la Fig. 9B muestra la tasa media de reducción de peso tumoral de los grupos de tratamiento respectivos (% de tasa de inhibición de peso tumoral) en comparación con el grupo de control negativo al final del experimento.

Las Figs. 10A y 10B son diagramas esquemáticos de resultados experimentales (Ejemplo 12 de la presente invención), que muestran que el anticuerpo humanizado hPV19 inhibe el crecimiento de rhabdomyoma humano A673 en ratones desnudos. En las que: la Fig. 10A muestra una tendencia relativa de crecimiento de volumen tumoral de los grupos respectivos durante el experimento; y la Fig. 10B muestra la tasa media de reducción de peso tumoral de los grupos

de tratamiento respectivos (% de tasa de inhibición de peso tumoral) en comparación con el grupo de control negativo al final del experimento.

5 Las Figs. 11A y 11B son diagramas esquemáticos de resultados experimentales (Ejemplo 13 de la presente invención), que muestran que el anticuerpo humanizado hPV19 inhibe el crecimiento de cáncer de colon humano HCT8 en ratones desnudos. En las que: la Fig. 11A muestra una tendencia relativa de crecimiento de volumen tumoral de los grupos respectivos durante el experimento; y la Fig. 11B muestra la tasa media de reducción de peso de tumor de los grupos de tratamiento respectivos (% de tasa de inhibición de peso tumoral) en comparación con el grupo de control negativo al final del experimento.

10 La línea celular de hibridoma de ratón que se codifica PV19-5 se ha conservado en el Common Microorganism Center of China Microbial Culture Preservation Commission desde el 12 de marzo, 2012 (número de ingreso: CGMCC No. 5889; lugar de ingreso: Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 3, Court No. 1, Beichen West Road, Distrito de Chaoyang, Beijing, R. P. China).

Descripción detallada de la invención

15 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración solamente y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1. Producción e identificación de líneas celulares de hibridoma de ratón que secretan anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular

Etapas 1. Producción de proteína humana recombinante VEGF165 (preparación de inmunogenicidad)

20 Se obtuvieron fragmentos de ADN que codifican humana VEGF165 mediante PCR usando cADN de células de tejido pulmonar humano como el modelo. Después de verificarlo mediante secuenciación, se cortó un segmento mediante digestión por endonucleasa de restricción y se clonó en pPic9K, un vector de expresión de levadura (Invitrogen Corporation), dando como resultado, de este modo, un plásmido de expresión recombinante pPic9K-VEGF165. Este plásmido se introdujo luego en la célula de levadura *Pichia pastoris*. Después de la fermentación y expresión inducible, se continuó con separación de proteína y purificación, se obtuvo proteína recombinante humana VEGF165 con más del 95% de pureza.

Etapas 2. Inmunización en ratones

30 a. Ratones Balb/c se inmunizaron con proteína humana VEGF165 (100 µl/ratón, 10 µg de proteína VEGF165 en total) que se mezcló con al adyuvante de Freund completo mediante inyecciones subcutáneas en múltiples puntos. Dos o tres semanas después de la primera inmunización, los ratones se inmunizaron mediante inyecciones subcutáneas en múltiples puntos, con proteína VEGF mezclada con adyuvante de Freund incompleto. Después de 2-3 veces de inmunizaciones de incentivo, se recolectó una pequeña cantidad de suero a partir de cada ratón inmunizado y la titulación de anticuerpo anti-VEGF se determinó mediante ELISA directo usando placas de 96 pozos recubiertas de proteína VEGF165. Se seleccionaron los ratones con titulaciones relativamente altas de anticuerpo anti-VEGF y se removieron los bazos para preparación de fusión celular.

Etapas 3. Fusión celular

40 Tres días después de la última inmunización, se removió el bazo de ratón y se prepararon esplenocitos en condiciones estériles y se fusionaron con las células de mieloma de ratón Sp2/0 (que se adquirió del Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences) en una proporción de 5:1 con PEG-1000 (Sigma) al 50%. La fusión celular se llevó a cabo siguiendo un método convencional (Kohler G. y Milstein C: Nature 1975; 256:495-497). Las células fusionadas se resuspendieron luego en 1x10⁶/ml con medio de RPMI 1640-FCS al 10% que contenía HAT (Sigma) (en las que la H representa hipoxantina, A representa aminopterina, y T representa timidina), que se agregó en placas de 96 pozos (200 µl/pozo), y se cultivó en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C durante 2-3 semanas.

Etapas 4. Barrido de anticuerpo que produce clones de hibridoma mediante ELISA

45 Las placas de microtitulación de ELISA se prepararon mediante recubrimiento con proteína recombinante humana VEGF165 (2 µg/ml, pH 9,6, solución de NaHCO₃ 0,1 M) a 37 °C durante 2 horas o durante la noche a 4 °C; se continuó mediante incubación con solución de bloqueo de albúmina de suero bovino al 2% (BSA) durante la noche a 4 °C. Después de lavado con la solución de PBS-Tween20 (PBST) al 0,1%, se agregaron los sobrenadantes a partir de células de hibridoma y se incubaron a 37 °C durante 2 horas (sobrenadante de cultivo de mieloma Sp2/0 sin fusionar como un control negativo). Después del lavado con la solución de PBS-Tween20 al 0,1%, se agregó peroxidasa de rábano picante (HRP)-IgG de cabra anti-ratón etiquetada (Sigma) y se permitió la incubación a 37 °C durante 1 hora; después del lavado por completo con la solución de PBS-Tween20 al 0,1% de nuevo, se agregó o-fenilenediamina como solución de sustrato (OPD)-H₂O₂ al 0,1% y se permitió que asentara durante 10-15 min para desarrollar color, a continuación se agregó una solución de terminación de HCl 0,1M. Las placas se aplicaron a un lector de microplaca MK3-Multiskan (Thermo Scientific) y se configuró lectura de OD a 492 nm. Las líneas celulares de hibridoma con un

valor a partir de la lectura de OD a 492 nm 5-10 veces más alto con respecto al control negativo se sometieron a subclonaje adicional, expansión y conservación por congelamiento.

Etapas 5. Subclonaje: dilución limitada de las células de hibridoma positivas

- 5 Las células positivas que se barrieron anteriormente se diluyeron a 1-10 células/pozo con medio de RPMI-1640-FCS al 10%, se agregaron en una placa de cultivo celular de 96 pozos, y se cultivaron en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C durante 2-3 semanas.

Después de que las células crecieron, los sobrenadantes se recolectaron y se evaluaron con respecto a la presencia de anticuerpo anti-VEGF mediante ELISA de nuevo. Se identificó un número de líneas celulares positivas. Después de subclonaje adicional, una línea celular de hibridoma codificada P19-5 (en adelante denominada como PV19), demostró que puede producir anticuerpo anti-VEGF estable. La Figura 1 muestra alta titulación de anticuerpo anti-VEGF que se detectó en el sobrenadante a partir de la línea celular de hibridoma PV19. El anticuerpo que se produce mediante hibridoma PV19 se identificó como IgG. Esta línea celular de hibridoma se amplificó de nuevo y se ha pasado a través de múltiples generaciones durante un período de tiempo prolongado. El anticuerpo que se produce mediante hibridoma PV19 se identificó como IgG. Esta línea celular de hibridoma se depositó también para conservación en el Common Microorganism Center of China Microbial Culture Preservation Commission desde el 12 de marzo, 2012 (número de ingreso: CGMCC No. 5889; lugar de ingreso: Beijing, R. P. China).

Ejemplo 2.

Producción y purificación de anticuerpo monoclonal VEGF de ratón anti-humano (PV19)

- 20 El anticuerpo monoclonal VEGF de ratón anti-humano (PV19) se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante el uso de una cromatografía de afinidad.

Las etapas de purificación son las siguientes:

Las células de hibridoma PV19, luego de ser amplificadas, se inocularon en 200 ml de medio 1640 libre de suero y se cultivaron a 37 °C durante 5 días. Luego, los sobrenadantes de cultivo se recolectaron y se filtraron a través de membrana de filtración de 0,45 µm, antes de cargarse a una columna para cromatografía de afinidad que contiene Proteína G-Flujo Rápido de Sefarosa (que se adquirió a partir de General Electric). La columna de cromatografía se sometió primero a lavado con PBS para retirar proteínas no específicas; se continuó con elución de proteína de anticuerpo PV19 adsorbida con una solución de glicina (0,1 M) de bajo pH (2,7-3,0). La proteína eluida se ajustó luego a pH de 7,0 con Tris 1 mM (pH 8,5-9,0), se dializó contra PBS (10 veces el volumen del eluido) durante 12-16 horas (cambiando solución 2-3 veces). Después de filtrarse a través de una membrana de filtración de 0,45 µm, se obtuvo luego el anticuerpo PV19 purificado.

El anticuerpo PV19 purificado se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (10% de gel separador, 5% de gel de carga) en condiciones reductoras por DTT y no reductoras. La Figura 2 muestra el patrón de análisis electroforético, donde el carril 1 es una muestra de anticuerpo PV19 reducido por DTT, y el carril 2 es una muestra de anticuerpo PV19 no reducido. Según se muestra en la Fig. 2, cuando se compara con la muestra de anticuerpo PV19 no reducida, el anticuerpo PV19 reducido por DTT se separa en dos bandas, donde la banda superior representa la cadena pesada de anticuerpo PV19 y la banda inferior representa la cadena ligera de anticuerpo PV19.

Ejemplo 3. Determinación de actividad biológica de anticuerpo monoclonal murino PV19: Inhibición de la unión de VEGF a VEGF-R mediante anticuerpo monoclonal PV19

Un método para determinar la actividad biológica del anticuerpo monoclonal murino PV19 consiste en usar un ELISA competitivo para probar la inhibición de la unión de VEGF a VEGF R mediante anticuerpo PV19.

El principio y el proceso de este método de ELISA competitivo son los siguientes: En primer lugar, se mezcla una cantidad fija de biotina-proteína humana VEGF165 etiquetada con diluciones en serie de anticuerpo PV19. Las mezclas se transfieren luego a una placa de 96 pozos prereducida con proteínas de receptor VEGF soluble (tal como proteína VEGFR1 soluble). Después de la incubación y lavado, se agrega enzima-Avidina etiquetada (tal como peroxidasa de rábano picante-Avidina etiquetada) en la placa. Después de otra incubación y lavado, se agrega el sustrato y se mide el valor de OD.

De manera específica, el ELISA competitivo consiste en lo siguiente:

- 50 1) Recubrir la placa de 96 pozos con proteína humana VEGFR1 soluble (R&D System Inc.) (2 µg/ml, 50 µl/pozo) a 4 °C durante la noche;
- 2) Enjuagar la placa con solución de PBS-tween-20 al 0,1% (PBS-T) y luego bloquearla con BSA al 2% (diluida en solución PBS-T) a temperatura ambiente durante 2 horas; después de ello, se agrega una mezcla de una cantidad fija de biotina-VEGF165 etiquetada (Bio-VEGF, 1:1000) con unas diluciones dobles en serie de ya sea anticuerpo PV19 o un anticuerpo no relacionado (W10) a la placa, y se incuba a 37 °C durante 2 h;

3) Lavar la placa con PBS-T, agregar luego peroxidasa de rábano picante-Avidina etiquetada (1:5000), e incubar a 37 °C durante 1 h;

5 4) Lavar la placa con PBS-T de nuevo, y agregar luego OPD-peróxido de hidrógeno al 3%; incubar a temperatura ambiente durante 10 min o hasta que se desarrolle color;

5) Detener la reacción mediante el agregado de HCL 0,1 M y medir la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 492 nm.

10 La Fig. 3 muestra un resultado representativo de este ELISA competitivo. Según se muestra en la Fig. 3, en el grupo de anticuerpo PV19 (mPV19&Biotina-VEGF), el valor de OD se correlaciona de manera inversa con la cantidad de la proteína de anticuerpo; a saber, cuanto mayor es la cantidad del anticuerpo PV19, menor resultará su valor de OD, mientras que en el grupo de anticuerpo no relacionado (W10&Biotina-VEGF), el valor de OD no se ve afectado por las diluciones del anticuerpo W10. Estos resultados demuestran que el anticuerpo PV19 puede bloquear la unión de VEGF a su receptor (VEGFR1).

Ejemplo 4

15 Clonación del gen que codifica la región variable de anticuerpo murino PV19

El anticuerpo PV19 purificado se separó en dos bandas que corresponden a la cadena pesada y la ligera, respectivamente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras por DTT y se transfirió luego a una membrana de PVDF. La membrana se tiñó con azul brillante coomassie R250 y las dos bandas de cadena pesada y ligera del anticuerpo PV19 se cortaron y se sometieron a secuenciación de aminoácidos N-terminal mediante el método de degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena ligera se obtuvo con éxito. Sin embargo, debido al bloqueo de extremo N-terminal, la secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena pesada no puede determinarse.

Procedimiento para clonación de ADN de región variable de cadena ligera de anticuerpo PV19

25 Etapa 1. Extraer el ARN total a partir de la célula de hibridoma PV19 de ratón con un equipo (Jiangsu Haimen Biyuntian Co.).

Etapa 2. Usar método de PCR con transcriptasa inversa PCR (RT-PCR) (reacción realizada en un tubo eppendorf), para obtener el modelo de cADN mediante el uso del cebador (mlg-kappa): TGTCGTTCACTGCCATCAAT (SEQ ID NO: 15);

Sistema de reacción RT-PCR:

Cebador	2 µl
---------	------

Sistema de reacción RT-PCR:

ARN total	30 µl
-----------	-------

Incubar a 72 °C durante 10 minutos, y mantener luego en hielo durante 2 minutos

Después de esto, agregar los siguientes reactivos:

5 X dNTPs reguladores de reacción PCR	10 µl 5 µl
---------------------------------------	------------

1,5 µl transcriptasa inversa PrimeScript

30 (continuación)

Agua destilada	1,5 µl
----------------	--------

Volumen total	50 µl
---------------	-------

La Reacción RT-PCR se llevó a cabo a 42 °C durante 1 hora, después de esta, se subió la temperatura a 75 °C y se mantuvo durante 15 minutos para inactivar la reacción. El cADN que se obtuvo se almacenó luego a -20 °C.

35 Etapa 3. Diseñar los siguientes cebadores de acuerdo con la secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena ligera de anticuerpo PV19:

Cebador hacia adelante (cebador 5'): GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA T (SEQ ID NO:16)

Cebador hacia atrás (cebador 3'): AAT TGG ATC CAG TTG GTG CAG CAT CAG C (SEQ ID NO:17)

Usar los cebadores anteriores y el cADN que se obtiene en la Etapa 2 como el modelo para configurar una amplificación mediante PCR, en la que la amplificación mediante PCR del ADN de la cadena ligera es la siguiente:

5

Cebador hacia adelante	5 µl
Cebador hacia atrás	5 µl
2,5mmol/L de dNTPs	5 µl
10X Regulador de reacción	5 µl
Modelo de cADN	2 µl
Polimerasa de ADN pfu	0,5 µl
Agua destilada	27,5 µl
Volumen total	50 µl

Los parámetros del ciclo de reacción PCR son los siguientes:

94 °C 5 m	30 ciclos
94 °C 30 s	
56 °C 30 s	
72 °C 1 m	
72 °C 10 m	

- 10 Etapa 4. Separar los productos de la reacción PCR en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. Después de la electroforesis, cortar la banda de ADN separada, y secuenciarla, obteniendo, de este modo, la secuencia de nucleótidos de ADN de la región variable de cadena ligera de anticuerpo PV19.

La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de anticuerpo PV19 se muestra en la SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos deducida se muestra en la SEQ ID NO:1, Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de esta cadena ligera se muestran en las SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11, respectivamente.

15

Procedimiento para clonación de ADN de región variable de cadena pesada de anticuerpo PV19

Debido a una falta de información de la secuencia de aminoácidos N-terminal, se usa un método de PCR con cebador degenerado para clonar el gen que codifica la región variable de cadena pesada de anticuerpo PV19.

- 20 Los cebadores que se usan para esta amplificación mediante PCR son los siguientes:

Cebador hacia adelante (cebador 5'): TCA G GCC ATT ACG GCC MMY CWM ACC AT (según se muestra en SEQ ID NO:18), en el que M representa A o C, Y representa C o T, W represente A o T.

Cebador hacia atrás (cebador 3'): AAT TGG ATC CTG GGG GTG TCG TTT TGG C (según se muestra en SEQ ID NO:19).

- 25 Al usar los cebadores anteriores y cADN que se preparó a partir de la línea celular de hibridoma de ratón PV19 como el modelo, una reacción PCR (el sistema de reacción PCR y los parámetros fueron similares a la reacción PCR de cadena ligera anterior) dio como resultado una amplificación de un fragmento de ADN correspondiente a la región variable de cadena pesada de anticuerpo PV19. El ADN amplificado mediante PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Después de la electroforesis, la banda de ADN se cortó y se sometió a secuenciación. La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de anticuerpo PV19 se muestra en la SEQ ID NO:4, y los aminoácidos deducidos se muestran en la SEQ ID NO:2. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de esta cadena pesada se muestran en las SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14, respectivamente.
- 30

Ejemplo 5. Generación de anticuerpo PV19 quimérico humano-ratón (chPV19)

Al fusionar el fragmento de ADN de región variable de cadena ligera de anticuerpo PV19 (que se describe en el Ejemplo 4) con un fragmento de ADN de región invariable de cadena ligera kappa humana (dominio C), se obtuvo una cadena ligera de anticuerpo PV19 quimérico humano-ratón (chPV19-L). Al fusionar el fragmento de ADN de región variable de cadena pesada de anticuerpo PV19 (que se describe en el Ejemplo 4) con un fragmento de ADN de región invariable de cadena pesada de IgG1 humana (dominio C), se obtuvo también una cadena pesada de anticuerpo PV19 quimérico humano-ratón (chPV19-H). Tanto la cadena ligera de anticuerpo PV19 quimérico (chPV19-L) como la cadena pesada (chPV19-H) se insertaron en el plásmido de expresión pcADN3.1, y el plásmido de expresión se introdujo luego en *E.coli* para amplificación de ADN plasmídico. Se obtuvieron grandes cantidades de plásmido de expresión.

Los plásmidos de expresión que contienen el gen de anticuerpo PV19 quimérico humano-ratón se mezclaron luego con liposomas (Fugen6, de Roche) y se transfectaron en las células de ovario de hámster chino (CHO). Dos o tres días después de la transfección, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular y la actividad de unión de VEGF se determinó mediante ELISA. El ELISA se llevó a cabo en placas de 96 pozos prereducidas con proteína humana VEGF165, con HRP-IgG de cabra anti-humana etiquetada como el anticuerpo secundario (anticuerpo de detección) (que se adquirió a partir de Shanghai Xitang Biotechnology Co.) Los resultados de ELISA demostraron que el anticuerpo quimérico (chPV19) presente en los sobrenadantes a partir de células de CHO transfectadas con este ADN plasmídico pudo unirse a la proteína humana VEGF.

Ejemplo 6. Verificación de ingeniería inicial del anticuerpo humanizado PV19 (hPV19)

Después de demostrar alta afinidad de unión del anticuerpo quimérico humano-ratón (chPV19) a la proteína humana VEGF mediante ELISA, una versión humanizada de PV19 se diseñó como sigue a continuación. Las regiones determinantes de complementariedad a antígeno (CDRs) de la cadena ligera de anticuerpo PV19 y de la cadena pesada de anticuerpo PV19 de ratón se identificaron y se trasplantaron en la región marco de cadena ligera-kappa humana correspondiente y región marco variable de cadena pesada-IgG1 humana, respectivamente, lo que generó, de este modo, una versión humanizada de anticuerpo PV19.

Humanización de la cadena ligera de anticuerpo PV19

Mediante el análisis de secuencia de aminoácidos, se demostró que el gen de línea germinal que codifica la cuarta región V de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana (IgkV4-1, ID de gen: 28908) tiene la homología más alta con la secuencia de cadena ligera de PV19. Por lo tanto, como una primera etapa, la secuencia de codificación de la región variable de cadena ligera de PV19 se ligó a la región invariable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana (GenBank: BC095489.1), dando como resultado, de este modo, un gen de cadena ligera quimérica de longitud completa (cPV19-L). En la próxima etapa, la región marco (FR) de cadena ligera de cPV19-L se substituyó mediante la secuencia homóloga de la IgkV4-1 humana mediante técnica de ADN recombinante, dando como resultado, de manera exitosa, una secuencia de codificación de cadena ligera de PV19 humanizado (hPV19-L). La secuencia de aminoácido de esta región variable de cadena ligera de anticuerpo hPV19 humanizado se muestra en la SEQ ID NO:5.

Humanización de la cadena pesada

Mediante el análisis de secuencia de aminoácidos, se demostró que el gen de línea germinal de la séptima región V de la cadena pesada de inmunoglobulina humana (IghV7-81, Gen del NCBI: 28378) tiene la homología más alta con la secuencia de cadena pesada de PV19. Por lo tanto, como una primera etapa, la secuencia de codificación de la región variable de la cadena pesada de anticuerpo PV19 se ligó a la región invariable de cadena IgG-Gamma1 de inmunoglobulina humana (GenBank: BC073782.1), dando como resultado un gen de cadena pesada quimérica de longitud completa (cPV19-H). En la próxima etapa, la región marco (FR) de cPV19-H se substituyó mediante la secuencia homóloga de la IghV7-81 humana mediante técnica de ADN recombinante, dando como resultado, de manera exitosa, una secuencia de codificación de cadena pesada de PV19 humanizado (hPV19-H). La secuencia de aminoácidos de esta región variable de cadena pesada de anticuerpo hPV19 humanizado se muestra en la SEQ ID NO:6.

Los fragmentos de ADN que codifican la cadena pesada quimérica (cPV19H), la cadena ligera quimérica (cPV19L), la cadena pesada humanizada (hPV19H), y la cadena ligera humanizada (hPV19L) se insertaron por separado en el vector de expresión pcADN3.1, para generar cuatro plásmidos de expresión de ADN recombinante diferentes. Estos ADN plasmídicos, en una combinación de a pares se transfirieron a células de ovario de hámster chino (CHO) para expresión génica. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los sobrenadantes de cultivo celular se recolectaron y se agregaron en placas recubiertas con proteína VEGF165. El anticuerpo de unión de VEGF se detectó luego mediante ELISA usando HRP-anticuerpo de cabra anti-IgG de humano etiquetado (que se adquirió a partir de Shanghai Xitang Biotechnology Co.) como el anticuerpo secundario y o-fenilenediamina (OPD) como el sustrato desarrollador de color.

El resultado de ELISA se muestra en la Tabla 1. Los datos muestran que como la versión quimérica del anticuerpo PV19, la versión humanizada del anticuerpo PV19 puede unirse también a la proteína VEGF165 humana.

Tabla 1. Detección de anticuerpos de unión a VEGF en los sobrenadantes a partir de células transfectadas transitoriamente mediante ELISA

Dilución de sobrenadante	Valor de OD			
	cPV19H+cPV19L	cPV19H+hPV19L	hPV19H+cPV19L	hPV19H+hPV19L
2	2,933	2,904	2,688	2,632
4	2,762	2,718	1,976	2,291
8	2,451	2,438	1,33	1,745
16	1,745	1,769	0,888	1,207
32	0,967	1,14	0,591	0,874
64	0,762	0,776	0,408	0,598
128	0,632	0,585	0,337	0,476
256	0,524	0,465	0,312	0,517

5 Ejemplo 7. Selección y generación de células de ingeniería que expresan anticuerpo hPV19 estable

Con el fin de obtener células diseñadas que expresan y secretan de manera estable anticuerpo hPV19 a un nivel adecuado para aplicación industrial, un enfoque según se muestra en este ejemplo de la presente invención consiste en lo siguiente: primero insertar el gen que contiene las cadenas ligeras o pesadas de anticuerpo HPV19 humanizado de manera simultánea en un plásmido de expresión pCDNA3.1-DHFR que contiene genes de dihidrofolato reductasa de hámster (DHFR), lo que da como resultado, de este modo, un plásmido recombinante denominado pQY-hPV19D-DHFR. Luego, mezclar este ADN plasmídico de expresión recombinante con un liposoma y transfectarlo en células de ovario de hámster chino deficientes de DHFR humano (CHO-DHFR^{-/-}). Las células transfectadas se cultivan luego en medio que contiene metotrexano (MTX). Al aumentar de manera gradual la concentración de MTX en el medio de cultivo, el número de copias de gen de DHFR (y también el gen de anticuerpo) en las células transfectadas, aumenta, lo que da como resultado, a su vez, una expresión de proteína de anticuerpo mejorada. De este modo, se obtienen las líneas celulares que expresan de manera estable y eficiente anticuerpos hPV19 humanizados.

Los procesos para la construcción de este plásmido recombinante así como también el barrido, la selección de MTX de estas líneas celulares de ingeniería son los siguientes:

Construcción de un plásmido de expresión (pHPV19D-DHFR) que contiene gen de anticuerpo hPV19 y gen de DHFR

En este ejemplo, un plásmido basado en pCDNA3.1 (pCDNA3.1-DHFR) que contiene gen de dihidrofolato reductasa de hámster (DHFR) se usó como el vector de clonación. La cadena ligera (hPV19L) y la cadena pesada (hPV19) de anticuerpo hPV19 humanizado se insertaron de manera simultánea en este plásmido, obteniendo de este modo un plásmido de expresión recombinante denominado pQYhPV19-DHFR. En este plásmido de expresión recombinante, el promotor que se usó para conducir la expresión del gen de DHFR en células de mamífero es el promotor temprano SV40 (pSV40), mientras que el promotor para conducir la expresión del gen de cadena ligera de anticuerpo hPV19 (hPV19L) es el promotor de subunidad 1- α de factor de elongación humana (pEF1- α), y el promotor para conducir la expresión del gen de cadena pesada de anticuerpo hPV19 (hPV19H) es el promotor temprano de citomegalovirus (pCMV).

Barrido preliminar de líneas celulares de ingeniería

Los liposomas FUGENE-HD (de Roche) se usaron como el reactivo de transfección para introducir ADN en células. Brevemente, mezclar los plásmidos de expresión pHPV19D-DHFR anteriores con liposomas FUGENE-HD, y agregar luego en células de ovario de hámster chino deficientes de DHFR (CHO-DHFR^{-/-}). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se retiró el medio de cultivo celular y se transfirió en placas de 96 pozos prereducidas con proteína humana VEGF165, la actividad de unión de anticuerpo-VEGF se determinó mediante un método de ELISA directo según se describe en el Ejemplo 6. Los resultados del ensayo de ELISA muestran que el medio de cultivo celular a partir de células transfectadas contiene anticuerpo que puede unirse al antígeno VEGF165 humano.

Después de tratarse con solución de tripsina, estas células transfectadas se retiraron y resuspendieron en medio de IMDM libre de HT, y se agregaron luego en placas de cultivo celular de 96 pozos mediante un método de dilución limitante. Después de cultivarse durante 5-7 días, el medio de cultivo celular se barrió por la presencia de anticuerpo de unión a VEGF mediante ELISA. Un total de alrededor de 400 clones de células individuales se barrieron y 380

demonstraron ser positivos (dando una proporción de clon positivo del 95%) con la titulación de expresión de anticuerpo de entre 1-10 µg/ml.

Selección adicional y barrido de líneas celulares mediante aumento de la concentración de metotrexano

- 5 Un número de líneas celulares positivas con niveles relativamente altos de expresión de anticuerpo se tomaron y se inocularon en placas de cultivo celular de 24 pozos para selección adicional mediante aumento gradual de la concentración de MTX que se presenta en el medio de cultivo.

En una primera ronda (inicial) ronda de selección, la concentración de MTX se configuró a 5 nM. Después de cultivarse durante 3-4 días, los sobrenadantes se recolectaron y la titulación del anticuerpo hPV19 se determinó mediante el método de ELISA. Estos clones con niveles incluso más altos de expresión de anticuerpo se tomaron y se inocularon en placas de cultivo celular nuevas de 24 pozos y se ingresaron en la próxima selección de ronda (Ronda 2) (concentración de MTX de esta ronda se aumentó a 10 nM); este proceso de selección y barrido se continuó mediante varias rondas más hasta que la concentración de MTX alcanzó más de 320 nM. Después de un total de 7-8 rondas de selección/barrido, varios clones demostraron tener titulación de expresión de proteína de anticuerpo de hasta 150-200 µg/ml (comparado con el caso antes de la selección de MTX, el nivel de expresión de proteína de anticuerpo aumento más de 20 veces) Algunos de estos clones de alta expresión se adaptaron además a cultivo de suspensión en media libre de suero. Sin optimización de medio de proceso de cultivo, el nivel de anticuerpo hPV19 que se produce mediante estas líneas celulares demostró encontrarse en el rango de entre 150-200 µg/ml, lo que resulta similar al nivel de expresión antes de la adaptación.

20 **Ejemplo 8. Producción a gran escala y caracterización de anticuerpo humanizado (hPV19)**

Las líneas celulares anteriores, que se han adoptado en cultivo de suspensión con medio libre de suero, se transfirieron a matraces de cultivo o biorreactores para amplificación adicional. Los sobrenadantes se recolectaron a partir de estos cultivos y se cargaron para cromatografía de afinidad por proteína A para purificación de anticuerpo. Después de procesarse a través de cromatografía de intercambio iónico, inactivación viral y filtración, se obtuvo más del 99% de anticuerpo humanizado hPV19 puro. La Fig. 4 es un patrón representativo de la electroforesis por SDS-PAGE de anticuerpo hPV19 purificado en condiciones reductoras por DTT y no reductoras, en las que el carril 1 representa el anticuerpo reducido por DTT, y el carril 2 representa el anticuerpo no reducido. Los resultados del gel de SDS-PAGE mostraron que en condiciones reductoras por DTT, el anticuerpo hPV19 se separó en dos bandas, en las que la banda superior representa la cadena pesada, y la banda inferior representa la cadena ligera; en condiciones no reductoras, el anticuerpo hPV19 se ubicó cerca del área de 150 kD, lo que resulta consistente con el peso molecular de un anticuerpo IgG1 completo que se espera teóricamente.

La actividad de unión a VEGF de anticuerpo humanizado (hPV19), anticuerpo quimérico (chPV19), y anticuerpo murino (mPV19) se determinó mediante un método de ELISA directo según se describe en el Ejemplo 5. La Fig. 5 muestra un resultado de ELISA representativo que muestra que el anticuerpo humanizado (hPV19) mantiene actividad de unión a VEGF165, con una potencia muy próxima a su anticuerpo murino (mPV19) matriz.

El bloqueo de unión de proteína humana VEGF165 (biotina-VEGF) a su receptor (VEGFR1) mediante anticuerpo humanizado (hPV19), anticuerpo quimérico (chPV19), y anticuerpo murino (mPV19) se determinó mediante un método de ELISA competitivo según se describe en el Ejemplo 6. La Fig. 6 muestra un resultado representativo de este resultado de ELISA competitivo, que muestra que el anticuerpo humanizado (hPV19) puede bloquear la unión de VEGF a VEGFR1, con una potencia muy próxima a su anticuerpo murino (mPV19) matriz.

Ejemplo 9. Determinación del sitio de unión a VEGF mediante el anticuerpo hPV19 y Avastin

De acuerdo con la literatura, el epítipo antigénico clave que se reconoce mediante A4.6.1 (Avastin) en proteína humana VEGF se encuentra próximo a la glicina en el 88^{mo} sitio (Gly, G88); si esta glicina se muta en alanina (mutación puntual G88/A), la unión de A4.6.1 o Avastin) con respecto a este mutante VEGF se reduce significativamente.

- 45 Con el fin de determinar si el sitio de unión de VEGF (epítipo) que se reconoce mediante el anticuerpo hPV19 tiene alguna diferencia con el que se reconoce mediante Avastin, se generó la proteína humana VEGF165 con una mutación puntual G88/A (Gly cambia a Ala). Este VEGF mutante, junto con el VEGF de tipo salvaje, se usaron como antígenos de captura para probar la afinidad de unión relativa del anticuerpo hPV19 y de Avastin en el método de ELISA. En el que, las etapas de implementación específicas y los resultados se describen como sigue a continuación:

50 **Etapas 1. Expresión y purificación de proteína VEGF con mutación G88/A**

Aquí, se usó un método PCR de extensión solapada para generar una molécula de VEGF con una mutación puntual. La tecnología de PCR de extensión solapada (nombre completo: empalme de genes mediante PCR de extensión solapada, denominada como SOE PCR), debido al uso de un cebador que tiene un extremo complementario, hace que el producto de PCR forme una cadena de solapamiento; así, mediante extensión de la cadena de solapamiento en la reacción de amplificación posterior, se solapan y empalman los fragmentos amplificados de diferentes fuentes; esta tecnología puede resultar efectiva en recombinación genética in vitro, y no requiere digestión por endonucleasa y tratamiento con ligasa, permitiendo obtener rápidamente productos que resultan difíciles de obtener mediante otros

métodos de digestión por endonucleasa de restricción; la clave del éxito de la tecnología PCR de extensión solapada consiste en el diseño de los cebadores complementarios solapados, teniendo la PCR de extensión solapada sus aplicaciones amplias y únicas en mutaciones de genes de sitio dirigido, construcción de genes fusionados, síntesis de genes de segmentos largos, bloqueo de genes, amplificación de los genes diana, y otros aspectos.

Al usar un par de los cebadores siguientes (cebador hacia adelante: VEGFG88F: CCT CAC CAA GCC CAG CAC ATA, según se muestra en la SEQ ID NO:20; cebador hacia atrás: VEGFG88R: CTA TGT GCT GGG CTT GGT GAG, según se muestra en la SEQ ID NO:21), los resultados de la PCR de extensión solapada en la amplificación de un fragmento de cADN que codifica VEGF165 humana con mutación puntual G88/A. Este fragmento de ADN de VEGF mutante se insertó luego en el vector de expresión pPic9K, y el plásmido recombinante se introdujo luego en las células de cepa GS115 de levadura *Pichia pastoris*. La proteína VEGF mutante se expresó luego y se purificó.

Etapla 2. Determinar la afinidad de unión relativa de hPV19 y Avastin a ya sea la proteína VEGF165 mutante y de tipo salvaje.

Los procedimientos experimentales generales para esta sección son los siguientes:

1) Recubrir una placa de 96 pozos de ELISA con ya sea proteína humana VEGF165 de tipo salvaje o proteína VEGF mutante (VEGF G88/A)

2) Una serie de diluciones dobles de anticuerpo hPV19 y Avastin se agregan a la placa de 96 pozos, incubar a 37 °C durante 1 hora.

3) Lavar la placa con PBST y agregar luego HRP-anticuerpo de cabra anti-Fc humano (diluido a 1:2000).

4) Lavar la placa de nuevo, y agregar luego el sustrato OPD para desarrollar color.

Los resultados de ELISA se muestran en la Fig. 7. Según se muestra en la Fig. 7, las uniones relativas de anticuerpo hPV19 y Avastin a la VEGF165 humana de tipo salvaje se encuentran muy próximas una con respecto a la otra; por otro lado, las uniones relativas de anticuerpo hPV19 y Avastin a la proteína VEGF mutante (VEGF G88/A) proteína son marcadamente diferentes; en comparación con su unión a la VEGF165 humana de tipo salvaje, la unión de Avastin a la proteína VEGF mutante (VEGF G88/A) proteína se redujo alrededor de 25 a 50 veces; mientras que la unión de hPV19 a la proteína VEGF mutante (VEGF G88/A) solo se redujo alrededor de 3 a 6 veces. Estos resultados indican que el sitio de unión de anticuerpo hPV19 a la proteína humana VEGF no es el mismo que el de Avastin.

Ejemplo 10. Anticuerpo humanizado hPV19 que inhibe el crecimiento de células trasplantadas de cáncer de colon Ls-174-T de humano en ratones desnudos

Etapla 1: Establecimiento de modelo de cáncer de colon humano Ls-174-T en ratones desnudos trasplantados

Dos ratones desnudos se prepararon para servir como ratones portadores de cáncer. 1×10^7 células de cáncer de colon humano Ls-174-T (que se adquirieron a partir del Cell Preservation Center of Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences) en el registro de ciclo de crecimiento, o masa tumoral en un tamaño de alrededor de $1,5 \text{ mm}^3$, se inocularon de manera subcutánea en la axila derecha de estos dos ratones desnudos. Una vez que el tumor creció a un tamaño de alrededor de $400\text{-}600 \text{ mm}^3$, los ratones portadores del tumor que parecían encontrarse sanos y en buena condición se seleccionaron y el tumor se retiró en condiciones asépticas y se procesó a una forma de nódulos tumorales de $1,5 \text{ mm}^3$ para usarse para inocular ratones experimentales, de manera subcutánea, en las axilas derechas, para experimentos de tratamiento.

Ratones desnudos que se inocularon con nódulos tumorales se observaron en cuanto a crecimiento tumoral. Cuando el volumen tumoral alcanzó alrededor de $50\text{-}100 \text{ mm}^3$, se realizó un barrido y aquellos ratones portadores de tumores demasiado pequeños o demasiado grandes se excluyeron. Los ratones que se seleccionaron se dividieron luego al azar en diferentes grupos mediante diferentes dosis de fármacos.

Etapla 2: Tratamiento de cáncer de colon humano Ls-174-T trasplantado mediante anticuerpo humanizado PV19

Los ratones desnudos anteriores que se inocularon con cáncer de colon Ls-174-T se dividieron en los siguientes cinco grupos de tratamiento (8 ratones/grupo). Los anticuerpos se inyectaron intraperitonealmente dos veces por semana durante 4 semanas.

Los grupos de tratamiento son los siguientes:

1) grupo de alta dosis de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de alta dosis, 10mg/kg de peso corporal);

2) grupo de dosis media de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis media, 5 mg/kg de peso corporal);

3) grupo de dosis baja de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis baja, 2,5 mg/kg de peso corporal);

4) grupo control de Avastin (5 mg/kg de peso corporal); y

5) grupo salino de control negativo.

5 Durante el tratamiento, los ratones se observaron en cuanto a síntomas clínicos generales dos veces por día, y el peso corporal y diámetros tumorales se midieron dos veces por semana. Al final del experimento, los tumores se retiraron después de eutanasia y se midió el peso tumoral. El efecto de tratamiento se midió mediante la proporción de tamaño de tumor en el grupo de ensayo (T) versus el grupo de control (C), a saber, % T/C. Si el % T/C $\leq$ 40, y valor de $p < 0,05$, el tratamiento se consideró efectivo, mientras se considera la tasa de inhibición de peso tumoral mayor que el 60% como el índice de referencia de validez.

Resultados de tratamiento:

10 Efecto en el crecimiento tumoral

Después de la primera administración ambos diámetros largo y corto de los tumores se registraron dos veces por semana, y se calcularon el volumen tumoral (V) y el volumen tumoral relativo (RTV). La fórmula de cálculo para RTV es: $RTV = V_t/V_o$, donde V_t es el volumen tumoral que se mide en cada punto de tiempo (día), y V_o es el volumen tumoral inicial (antes de la administración).

15 La tendencia de crecimiento de tumor relativa del tumor Ls-174-T en cada grupo se muestra en la Fig. 8A, en comparación con el grupo salino de control negativo, el tratamiento con anticuerpo humanizado hPV19 inhibió significativamente el crecimiento tumoral.

Efecto en peso tumoral

20 En el día 29, cada animal se sometió a eutanasia, y su tumor se retiró y se pesó y se calculó el peso medio tumoral en cada grupo.

El grupo salino de control negativo tuvo un peso medio tumoral de 2,957 g.

El grupo Avastin tuvo un peso medio tumoral de 0,767 g, que resulta significativamente más bajo con respecto al del grupo de control negativo ($P \leq 0,01$).

25 Los pesos tumorales de los grupos de tratamiento de dosis alta, media y baja utilizando anticuerpo humanizado hPV19 fueron 0,467 g, 0,631 g y 0,883 g, respectivamente, todos ellos resultan significativamente más bajos que el del grupo negativo de control ($P \leq 0,01$ o $P \leq 0,001$).

30 La tasa de inhibición de peso tumoral se muestra en la Fig. 8B. El grupo de tratamiento de Avastin tuvo una tasa de inhibición de peso tumoral del 74,05%, y los grupos de tratamiento de dosis alta, media y baja de anticuerpo hPV19 tuvieron tasas de inhibición de peso tumoral del 70,15%, 78,66%, 84,21% respectivamente. Estos resultados demuestran que el anticuerpo hPV19 puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral, y el grado de inhibición fue similar al de Avastin.

Ejemplo 11. Anticuerpo monoclonal humanizado hPV19 que inhibe el crecimiento de cáncer de mama humano MDA-MB-231 trasplantado en ratones desnudos

Etapas 1: Establecimiento de modelo de cáncer de mama humano MDA-MB-231 trasplantado en ratón desnudo

35 El establecimiento del modelo de tumor es básicamente el mismo que el del Ejemplo 10.

Ratones desnudos se inocularon con cáncer de mama humano MDA-MB-231. Cuando el volumen tumoral alcanzó alrededor de 50-100 mm³, se realizó un barrido y aquellos ratones portadores de tumores demasiado pequeños o demasiado grandes se excluyeron. Los ratones que se seleccionaron se dividieron luego al azar en diferentes grupos para diferentes dosis de fármacos.

40 Etapa 2: Tratamiento de cánceres de mama humanos MDA-MB-231 trasplantados con anticuerpo humanizado PV19

Los ratones desnudos anteriores que se inocularon con cáncer de mama humano MDA-MB-231 se dividieron en los siguientes cinco grupos de tratamiento (7 ratones/grupo). Los anticuerpos se inyectaron intraperitonealmente dos veces por semana durante 5 semanas, y el ensayo se finalizó en el 36^{to} día (D36).

Los grupos de tratamiento son los siguientes:

- 45 1) grupo de alta dosis de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de alta dosis, 10mg/kg de peso corporal);
2) grupo de dosis media de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis media, 5 mg/kg de peso corporal);
3) grupo de dosis baja de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis baja, 2,5 mg/kg de peso corporal);
4) grupo control de Avastin (5 mg/kg de peso corporal); y

5) grupo salino de control negativo.

5 Durante el tratamiento, los ratones se observaron en cuanto a síntomas clínicos generales dos veces por día, y el peso corporal y diámetros tumorales se midieron dos veces por semana. Al final del experimento, los tumores se retiraron después de eutanasia y se midió el peso tumoral. El efecto de tratamiento se midió mediante la proporción de tamaño de tumor en el grupo de ensayo (T) versus el grupo de control (C), a saber, % T/C. Si el % T/C $\leq$ 40, y valor de $p < 0,05$, el tratamiento se consideró efectivo, mientras se considera la tasa de inhibición de peso tumoral mayor que el 60% como el índice de referencia de validez.

Resultados de tratamiento:

10 Efecto en crecimiento tumoral

Después de la primera administración, los diámetros largo y corto del tumor se registraron dos veces por semana, y se calcularon el volumen tumoral (V) y el volumen tumoral relativo (RTV) de este (V_t/V_0). La tendencia de crecimiento de volumen tumoral relativa del tumor MDA-MA-231 en cada grupo se muestra en la Fig. 9A. Según se muestra en la Fig. 9A, en comparación con el grupo salino de control negativo, el anticuerpo humanizado hPV19 puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral.

Efecto en peso tumoral

En el día 36, cada animal se sometió a eutanasia, y su tumor se retiró y se pesó y se calculó el peso medio tumoral en cada grupo.

El grupo de control negativo tiene el peso medio tumoral de 0,890 g.

20 El grupo Avastin tiene el peso medio tumoral de 0,543 g, que no resulta significativamente diferente con respecto al grupo de control negativo ($P > 0,05$).

Los grupos de dosis alta, media y baja de anticuerpo humanizado hPV19 tienen los pesos medios tumorales de 0,357 g, 0,298 g y 0,576 g, respectivamente, que no resultan significativamente diferentes en comparación con el grupo de control negativo ($P > 0,05$).

25 La tasa de inhibición de peso tumoral de cada grupo se muestra en la Fig. 9B: el grupo de tratamiento de Avastin tiene una tasa de inhibición de peso tumoral del 39,99%, y los grupos de dosis alta, media y baja del tratamiento con anticuerpo humanizado hPV19 tienen las tasas de inhibición de peso tumoral del 35,20%, 66,56%, 59,92%, respectivamente. Estos resultados indican que el anticuerpo humanizado hPV19 de los grupos de dosis alta y media puede inhibir el crecimiento tumoral en diferente medida, con el grado de mayor inhibición con respecto al Avastin del mismo grupo de dosis.

Ejemplo 12. Anticuerpo humanizado hPV19 que inhibe el crecimiento de rabdomiosarcoma humano A673 trasplantado en ratones desnudos

Etapas 1: Establecimiento de modelo de rabdomiosarcoma humano A673 trasplantado en ratón desnudo

El establecimiento de este método de tumor es básicamente el mismo que el del Ejemplo 10.

35 Ratones desnudos se inocularon con rabdomiosarcoma humano A673. Cuando el volumen tumoral alcanzó alrededor de 50-100 mm³, se realizó un barrido y aquellos ratones portadores de tumores demasiado pequeños o demasiado grandes se excluyeron. Los ratones que se seleccionaron se dividieron luego al azar en diferentes grupos para diferentes dosis de fármacos.

Etapas 2: Tratamiento del rabdomiosarcoma humano A673 con el anticuerpo humanizado PV19

40 Los ratones desnudos anteriores que se inocularon con el rabdomiosarcoma humano A673 se dividieron en los siguientes seis grupos de tratamiento (6 ratones/grupo) para administración inyectando intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas, y finalizando el ensayo en el 22^{do} día (D22).

Los grupos de administración son los siguientes:

1) grupo de alta dosis de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de alta dosis, 10mg/kg de peso corporal);

45 2) grupo de dosis media de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis media, 5 mg/kg de peso corporal);

3) grupo de dosis baja de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis baja, 2,5 mg/kg de peso corporal);

4) grupo de dosis ultrabaja de anticuerpo humanizado hPV19 (dosis ultrabaja, 0,5 mg/kg de peso corporal);

5) grupo control de Avastin (5 mg/kg de peso corporal); y

6) grupo salino de control negativo.

Durante el tratamiento, los ratones se observaron en cuanto a síntomas clínicos generales dos veces por día, y el peso corporal y diámetros tumorales se midieron dos veces por semana. Al final del experimento, los tumores se retiraron después de eutanasia y se midió el peso tumoral. El efecto de tratamiento se midió mediante la proporción de tamaño tumoral en el grupo de ensayo (T) versus el grupo de control (C), a saber, % T/C. Si el % T/C $\leq$ 40, y valor de $p < 0,05$, el tratamiento se consideró efectivo, mientras se considera la tasa de inhibición de peso tumoral mayor que el 60% como el índice de referencia de validez.

Resultados de tratamiento:

Efecto en crecimiento tumoral

Después de la primera administración, los diámetros largo y corto del tumor se midieron dos veces por semana, y se calcularon el volumen tumoral (V) y el volumen tumoral relativo (RTV) de este (V_t/V_0). La tendencia de crecimiento de volumen tumoral relativa del tumor A673 de cada grupo se muestra en la Fig. 10A. Según se muestra en la Fig. 10A, en comparación con el grupo salino de control negativo, el anticuerpo humanizado hPV19 puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral.

Efecto en peso tumoral

En el día 22, cada animal se sometió a eutanasia, y su tumor se retiró y se pesó y se calculó el peso medio tumoral de cada grupo.

En el día 22, cada animal se sometió a eutanasia, y su tumor se retiró y se pesó y se calculó el peso medio tumoral de cada grupo.

El grupo de control negativo tiene el peso medio tumoral de 8,726 g.

El grupo Avastin tiene el peso medio tumoral de 3,323 g, que resulta significativamente menor con respecto al grupo de control negativo ($P \leq 0,05$).

Los pesos medios tumorales de los grupos de dosis alta, media, baja y ultrabaja del tratamiento con anticuerpo humanizado hPV19 fueron 2,499 g, 3,046 g, 3,811 g y 7,056 g, respectivamente. En comparación con el grupo de control negativo, los grupos de dosis alta, media y baja del anticuerpo humanizado hPV19 tienen un peso medio tumoral significativamente reducido ($P \leq 0,05$).

Se calculó la tasa de inhibición de peso tumoral de acuerdo con el peso medio tumoral de cada grupo (Fig. 10B), que muestra que el grupo Avastin tiene una tasa de inhibición de peso tumoral del 61,92%, y los grupos de dosis alta, media, baja y ultrabaja del anticuerpo humanizado hPV19 tienen las tasas de inhibición de peso tumoral del 56,33%, 65,09%, 71,36% y 19,13%, respectivamente. Estos resultados indican que el anticuerpo humanizado hPV19 de los grupos de dosis alta y media puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral con el mismo grado de inhibición tanto como Avastin.

Ejemplo 13. Anticuerpo humanizado hPV19 que inhibe el crecimiento de cáncer de colon humano HCT-8 de trasplantado en ratones desnudos

Etapas 1: Establecimiento de modelo de cáncer de colon humano HCT-8 trasplantado en ratones desnudos

El método de establecimiento es básicamente el mismo que el del Ejemplo 10.

Se observó el crecimiento tumoral de los ratones desnudos que se inocularon con cáncer de colon humano HCT-8 y, cuando el volumen tumoral es de alrededor de 50-100 mm³, se realizó un barrido de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, no seleccionando el tumor demasiado grande ni el tumor menor.

Etapas 2: Tratamiento del cáncer de colon humano HCT-8 mediante anticuerpo humanizado PV19

Los ratones desnudos anteriores que se inocularon con cáncer de colon humano HCT-8 se dividieron en los siguientes siete grupos (8 ratones/grupo) para administración, inyectando intraperitonealmente dos veces por semana de manera sucesiva durante 4 semanas, y finalizando el ensayo en el 30^{mo} día (D30).

El agrupamiento para tratamiento es sustancialmente el mismo que el del Ejemplo 9, con excepción del agregado de grupo de control de fármaco quimioterapéutico cisplatino y una combinación de grupo de tratamiento de cisplatino y anticuerpo hPV19.

El agrupamiento para tratamiento es específicamente como sigue a continuación:

1) grupo de alta dosis de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de alta dosis para el ensayo, 10mg/kg de peso corporal);

2) grupo de dosis media de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis media para el ensayo, 5 mg/kg de peso corporal);

5 3) grupo de dosis baja de anticuerpo humanizado hPV19 (grupo de dosis baja para el ensayo, 2,5 mg/kg de peso corporal);

4) grupo de dosis ultrabaja de anticuerpo humanizado hPV19 (dosis ultrabaja para el ensayo, 0,5 mg/kg de peso corporal);

5) grupo de control de quimioterapia con cisplatino (5mg/kg de peso corporal);

10 6) grupo de tratamiento de combinación (el anticuerpo hPV19 para el ensayo 5 mg/kg + cisplatino 5 mg/kg de peso corporal); y

7) grupo salino de control negativo.

15 Durante el tratamiento, los ratones se observaron en cuanto a síntomas clínicos generales dos veces por día, y el peso corporal y diámetros tumorales se midieron dos veces por semana. Al final del experimento, los tumores se retiraron después de eutanasia y se midió el peso tumoral. El efecto de tratamiento se midió mediante la proporción de tamaño de tumor en el grupo de ensayo (T) versus el grupo de control (C), a saber, % T/C. Si el % T/C $\leq$ 40, y valor de $p < 0,05$, el tratamiento se consideró efectivo, mientras se considera la tasa de inhibición de peso tumoral mayor que el 60% como el índice de referencia de validez.

Resultados de tratamiento:

Efecto en crecimiento tumoral

20 Después del primer tratamiento, los diámetros largo y corto del tumor se midieron dos veces por semana, y se calcularon el volumen tumoral V y el volumen tumoral relativo RTV de este (V_t/V_0).

La tendencia de crecimiento de volumen tumoral relativa del HCT-8 de cada grupo se muestra en la Fig. 11A, los resultados muestran que, en comparación con el grupo salino de control negativo, los anticuerpos humanizados HPV19 de los grupos de dosis respectivos pueden inhibir el crecimiento tumoral.

25 Efecto en peso tumoral

En el día 30, cada animal se sometió a eutanasia, y su tumor se retiró y se pesó y se calculó el peso medio tumoral de cada grupo.

El grupo de control negativo tiene el peso medio tumoral de 1,608 g.

30 El peso medio tumoral del grupo de cisplatino único es de 1,201 g, el cual no resulta significativamente diferente en comparación con el grupo de control negativo.

35 Los grupos de dosis alta, media, baja y ultrabaja de tratamiento con anticuerpo monoclonal humanizado hPV19 tienen los pesos medios tumorales de 0,311 g, 0,278 g, 0,405 g y 0,604 g, respectivamente, que resultan significativamente menores con respecto al grupo de control negativo ($P \leq 0,01$ o $P \leq 0,05$); el peso medio tumoral del grupo de tratamiento combinado de anticuerpo monoclonal hPV19 y cisplatino es de 0,193 g, que resulta significativamente menor con respecto al grupo de control negativo ($P \leq 0,01$).

40 La tasa de inhibición de peso tumoral de cada grupo se muestra en la Fig. 11B. Esta muestra que la tasa de inhibición de peso tumoral del grupo de tratamiento con cisplatino único es del 25,29%, y las tasas de inhibición de peso tumoral de los grupos de dosis alta, media, baja y ultrabaja para el ensayo y del grupo de tratamiento combinado son 80,65%, 82,73%, 74,81%, 62,46% y 87,98%, respectivamente. Estos resultados indican que el anticuerpo humanizado hPV19 de cada grupo de dosis puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral, lo cual resulta todavía efectivo incluso en dosis ultrabaja (0,5 mg/kg). De manera adicional, el tratamiento con anticuerpo humanizado hPV19 en combinación con fármaco quimioterapéutico de cisplatino resulta mejor, de manera evidente, en comparación con ya sea un grupo de tratamiento con cisplatino único (5 mg/kg) o un grupo de tratamiento con anticuerpo hPV19 único (5mg/kg).

45 La presente invención proporciona el gen que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera después de separación de proteína, purificación, ingeniería genética y otros medios. Además, la presente invención completa la humanización de este anticuerpo sobre la base anterior. El fragmento de ADN que codifica el anticuerpo humanizado se insertó en el vector de expresión (pCDNA3.1), y se transfirió a células de ovario de hámster chino (CHO) para obtener líneas celulares huéspedes recombinantes. El anticuerpo humanizado PV19 puro, con la actividad biológica de inhibición de crecimiento tumoral *in vivo*, se obtuvo a partir de medio de cultivo celular mediante purificación. Este anticuerpo humanizado puede usarse como un componente farmacéutico, o prepararse como una formulación farmacéutica adecuada, usarse de manera única o en combinación con fármacos quimioterapéuticos y otras terapias, para tratamiento de un amplio espectro de diversos tumores sólidos, tales como cáncer de colon, cáncer de mama y rhabdomyosarcoma.

Listado de secuencias

<110> SUZHOU STAINWEI BIOTECH INC.

5 <120> UN ANTICUERPO MONOCLONAL CAPAZ DE INHIBIR LA UNIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR A SU RECEPTOR: SU SECUENCIA DE CODIFICACIÓN Y APLICACIONES

<130> DAPCT-1797

<140> EU 13863651.9

<141> 2013-11-05

<150> PCT/CN2013/086542

10 <151> 2013-11-05

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Pro Thr
100 105

<210> 2

20 <211> 116

<212> PRT

ES 2 719 084 T3

<213> Mus musculus

<400> 2

5

Gln Pro Gly Gly Ala Phe Trp Met Cys Val Ser Gly Gly Lys Val Thr
1 5 10 15

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Ser Gly Ile Asn
35 20 40 25 45 30

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr Leu Gln Ile
65 70 75 80

Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Phe
85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser
115

<210> 3

10

<211> 324

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 3

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

ttgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaaaaa cttcttggct 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactactga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300

tacacgttcg gcggggggacc aacc 324

15

<210> 4

<211> 348

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 4

cagcctgggg gtgccttttg gatgtgtgtt tctggcggga aagtcactat ctcctgcaag 60
gcttctggat attccttcac aaactctgga attaactggg tgaagcaggc tccaggaaaag 120
ggtttaaagt ggatgggctg gataaacacc tacactggag agccaacata tgctgatgac 180
ttcaagggac ggtttgcctt ctctttggaa acctctgcca gctctgccta tttgcagatc 240
aacaacctca aaaatgagga cacggctaca tatttctgtg caagattcgg agatgggttac 300
tactggttct tcgatgtctg gggcgcaggg accacggtca ccgtctcc 348

<210> 5

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

Arg Thr Arg Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10 <210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Asn Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Ser
20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Gly Asp Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val
115

<210> 7

5 <211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaaaaa cttcttggt 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactactga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgttcg gcggggggac caacctggaa ataaaacgt 339

10 <210> 8

<211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 719 084 T3

gacgtccagc tgggtgcagtc tggagttgag gtgaagaacc ctggggcctc agtaaaggct 60
 tcctgcaggg cttctgggta ctcccttcaca aactctggaa ttaactgggt gaagcaggct 120
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gccaacatat 180
 gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag ctctgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagattcgga 300
 gatggttact actggttctt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcc 357

<210> 9

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 10

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

15 <210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

20

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 12

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Ser Gly Ile Asn
 1 5 10

<210> 13

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 13
 Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 14
 Phe Gly Asp Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp
 1 5 10
 <210> 15
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores
 20 <220>
 <221> misc_característica
 <223> Cebadores
 <400> 15
 tgtcgttcac tgccatcaat 20
 25 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebadores
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> Cebadores
 <400> 16
 35 gacattgtga tgcacagtc tccat 25
 <210> 17
 <211> 28

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebadores
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> Cebadores
 <400> 17
 10 aattggatcc agttggtgca gcatcagc 28
 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebadores
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> Cebadores
 20 <400> 18
 tcaggccatt acggccmmyc wmaccat 27
 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores
 <220>
 <221> misc_característica
 30 <223> Cebadores
 <400> 19
 aattggatcc tgggggtgtc gttttggc 28
 <210> 20
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores

<220>
 <221> misc_característica
 <223> Cebadores
 5 <400> 20
 cctcaccaag cccagcacat a 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores
 <220>
 <221> misc_característica
 15 <223> Cebadores
 <400> 21
 ctatgtgctg ggcttggtga g 21

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal murino que inhibe de manera antagonista la unión del factor de crecimiento endotelial vascular al receptor de este, caracterizado porque: la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de este anticuerpo se muestra en la SEQ ID NO:1, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO:2.
2. Una molécula de ADN que codifica el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque: la secuencia de ácidos nucleicos de su región variable de cadena ligera se muestra en el SEQ ID NO:3 y la secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO:4.
3. Un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe de manera antagonista la unión del factor de crecimiento endotelial vascular al receptor de este, caracterizado porque: la región variable de cadena pesada de anticuerpo y la región variable de cadena ligera de anticuerpo del anticuerpo monoclonal murino de acuerdo con la reivindicación 1 son humanizadas, incluyendo sustitución de aminoácidos de una región marco; en el que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado se muestra en la SEQ ID NO:5 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado se muestra en la SEQ ID NO:6.
4. Una molécula de ADN o gen que codifica el anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque: la secuencia de ácidos nucleicos de su región variable de cadena ligera se muestra en el SEQ ID NO:7 y la secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO:8.
5. Un derivado del anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque: la secuencia de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad a antígeno de cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, y la secuencia de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad a antígeno de cadena pesada se muestran en la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:14.
6. Un vector de expresión, caracterizado porque: contiene la secuencia de ADN de acuerdo con la reivindicación 4 y una secuencia operativa necesaria para la expresión de la secuencia de ADN anterior.
7. Una línea celular huésped recombinante, caracterizada porque: se transfecta con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
8. La línea celular huésped recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 y las células hijas de esta, en la que la célula huésped recombinante o las células hijas de esta expresan el anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 3.
9. Una composición farmacéutica, caracterizada porque: contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 3 o el derivado del anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 5 y el vector farmacéuticamente aceptable de este.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis.
11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada porque: las enfermedades incluyen cáncer de colon, cáncer de mama y rhabdomyosarcoma.
12. Un método para preparar el anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque: este incluye las siguientes etapas:
 - a) Proporcionar un vector de expresión, que contiene la secuencia de ADN de acuerdo con la reivindicación 4 y una secuencia operativa necesaria para la expresión de la secuencia de ADN anterior;
 - b) transformar la célula huésped con el vector de expresión de la Etapa a);
 - c) cultivar la célula huésped de la Etapa b) en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo monoclonal humanizado; y
 - d) separar, purificar y recolectar el anticuerpo monoclonal humanizado a partir de los sobrenadantes de cultivo de célula huésped.

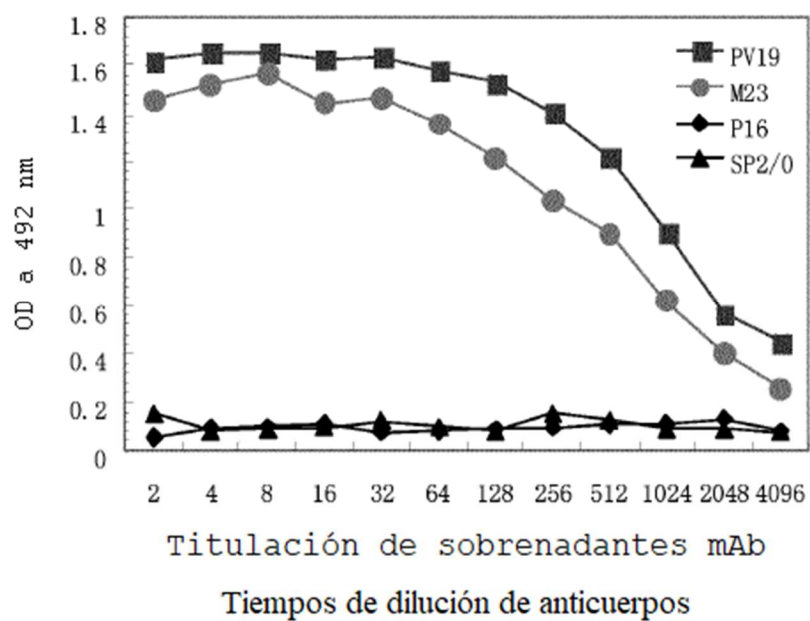


Fig. 1

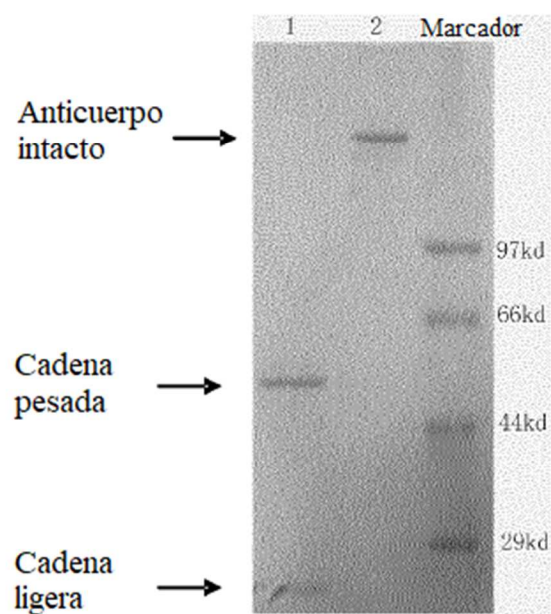


Fig. 2

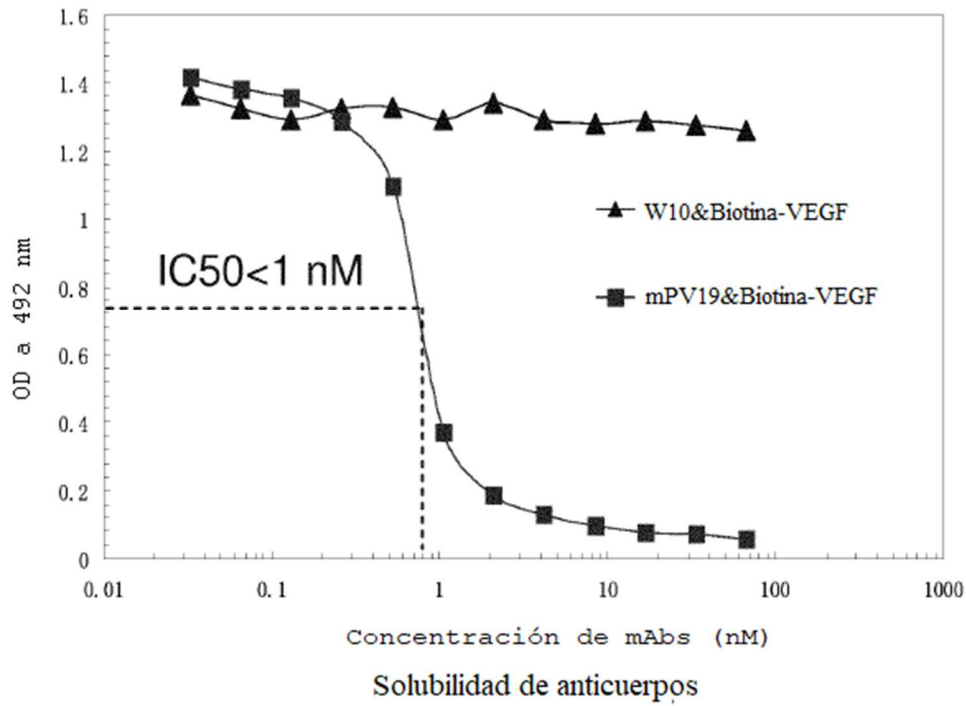


Fig. 3

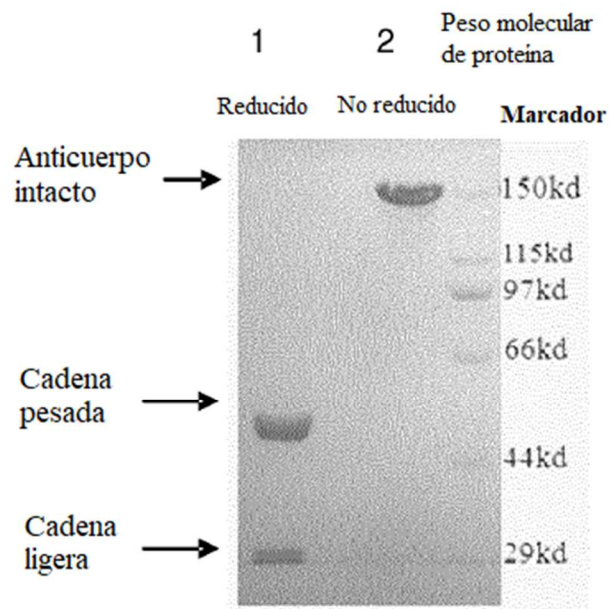


Fig. 4

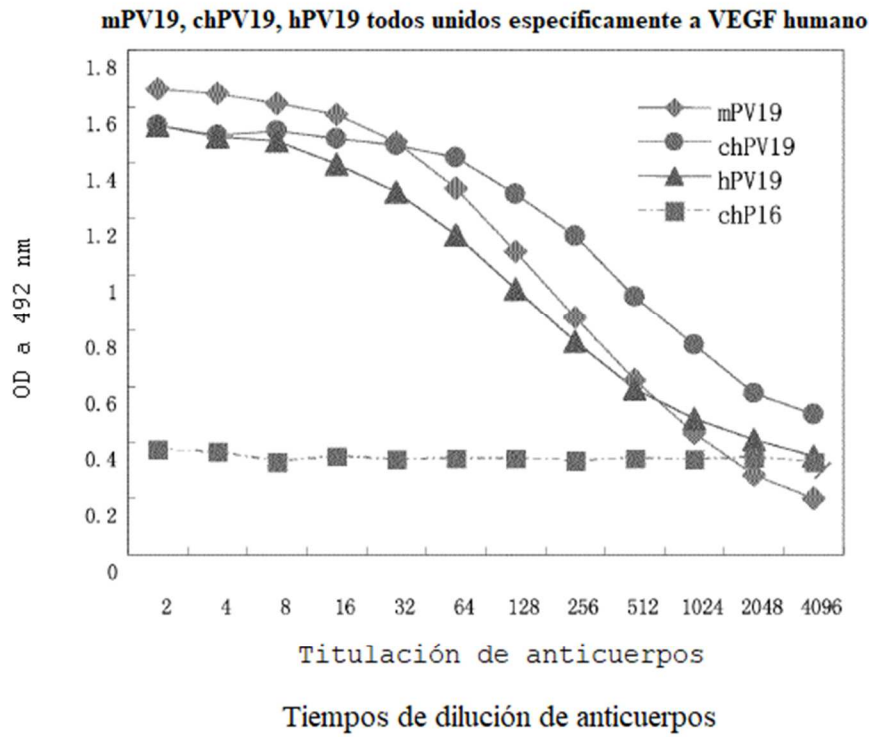


Fig. 5

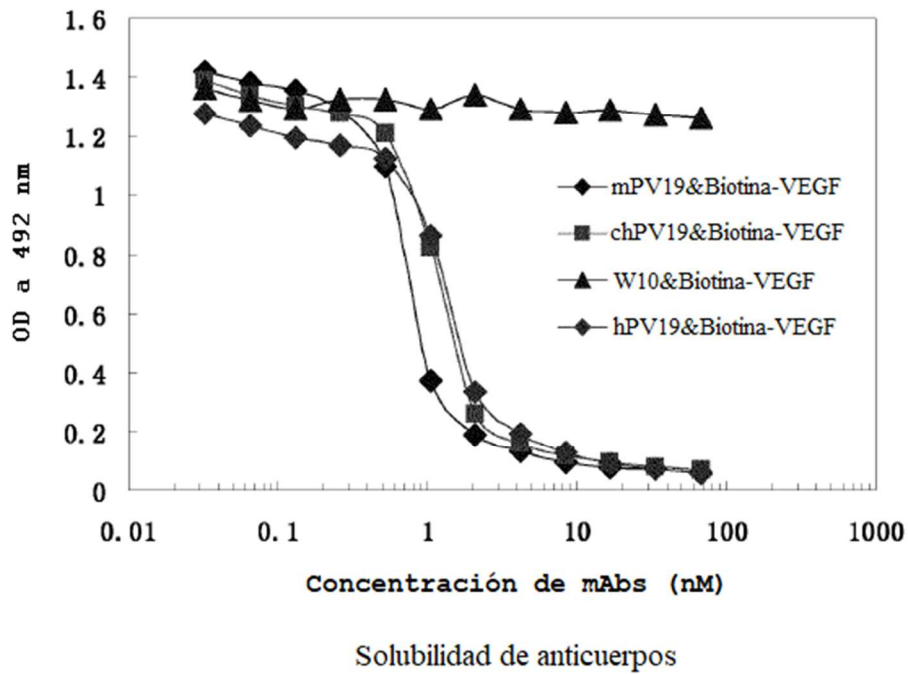


Fig. 6

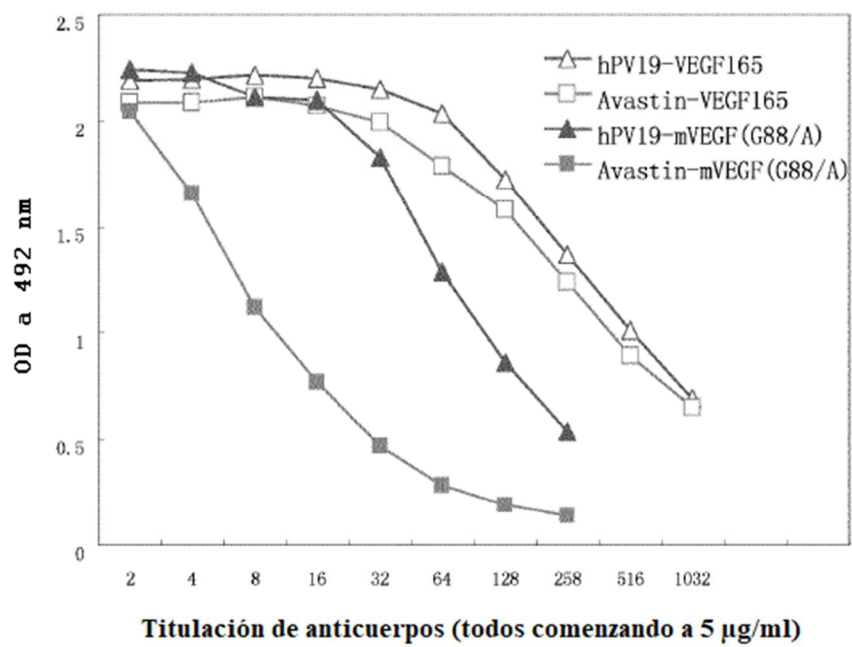
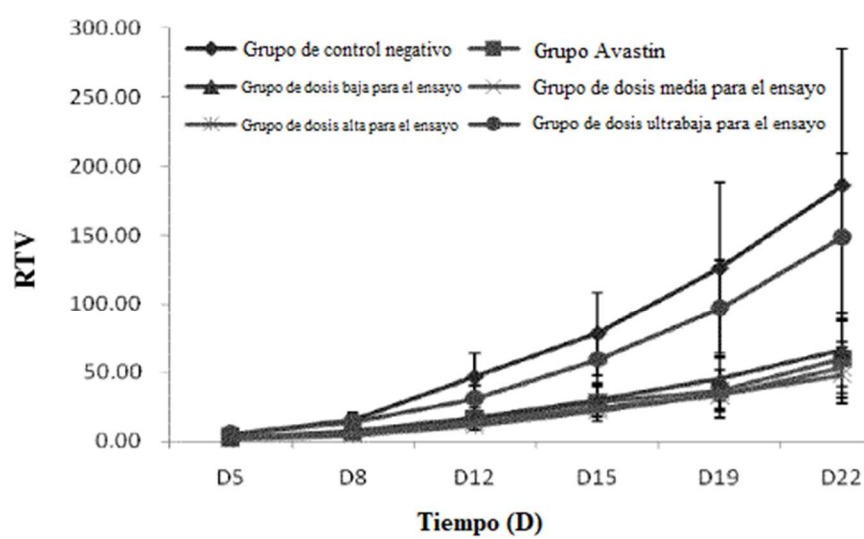
Afinidad de unión relativa de hPV19 y Avastin a VEGF165 de tipo salvaje o mutante G88/A

Fig. 7



Volumen relativo de crecimiento tumoral (modelo de tumor A673)

Fig. 8A

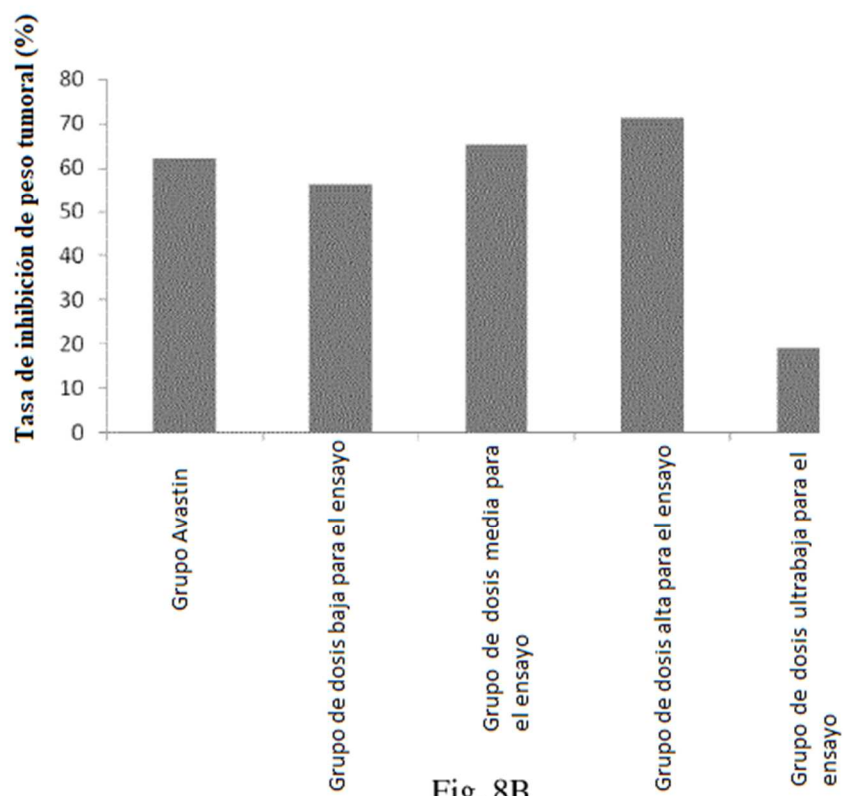


Fig. 8B

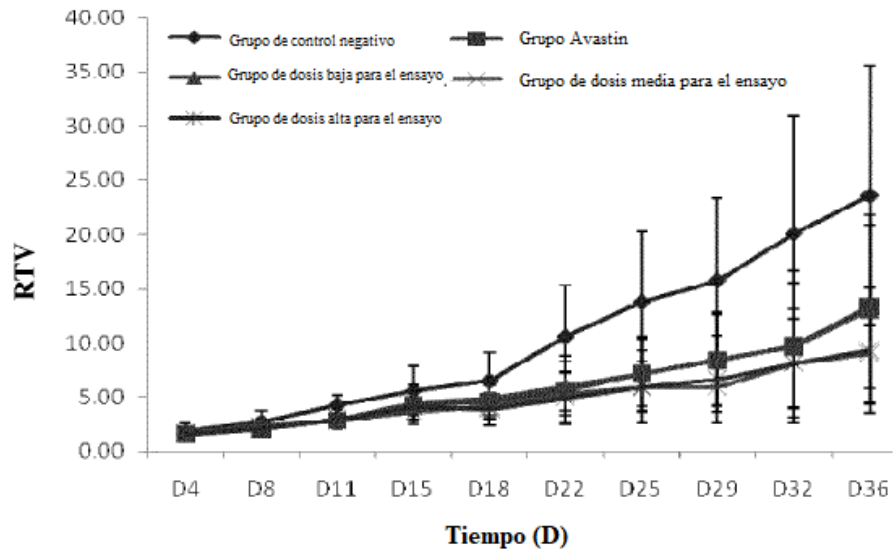


Fig. 9A

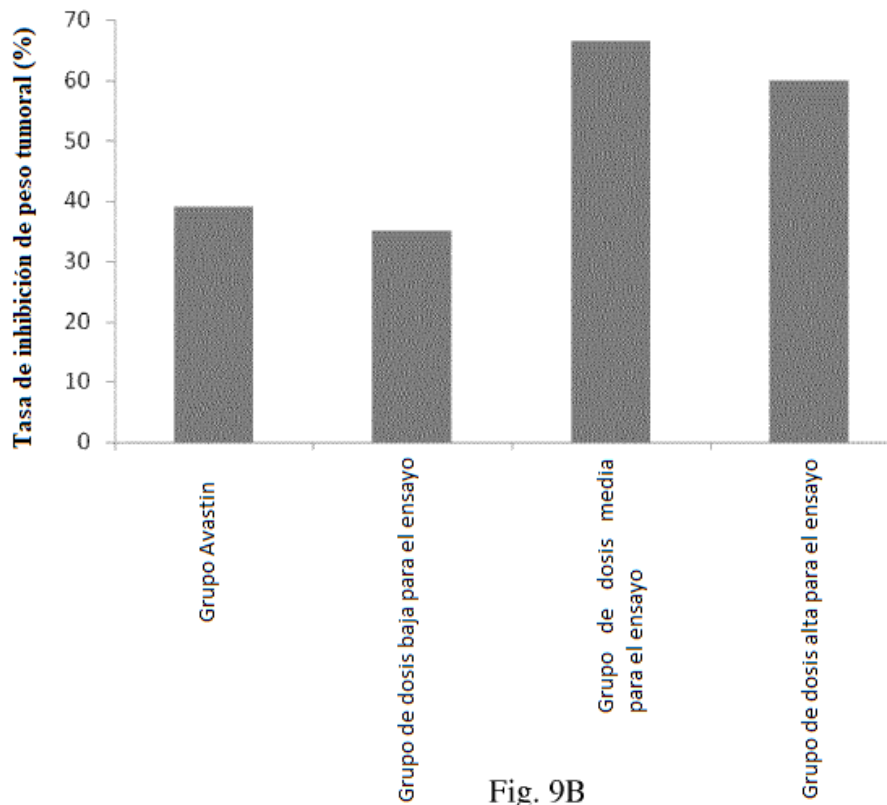
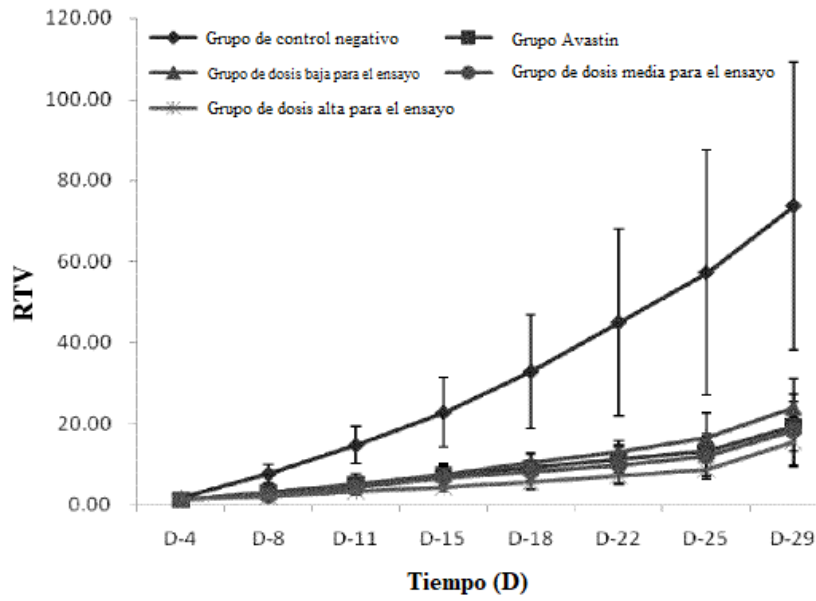


Fig. 9B



Volumen relativo de crecimiento tumoral (modelo de tumor Ls-174)

Fig. 10A

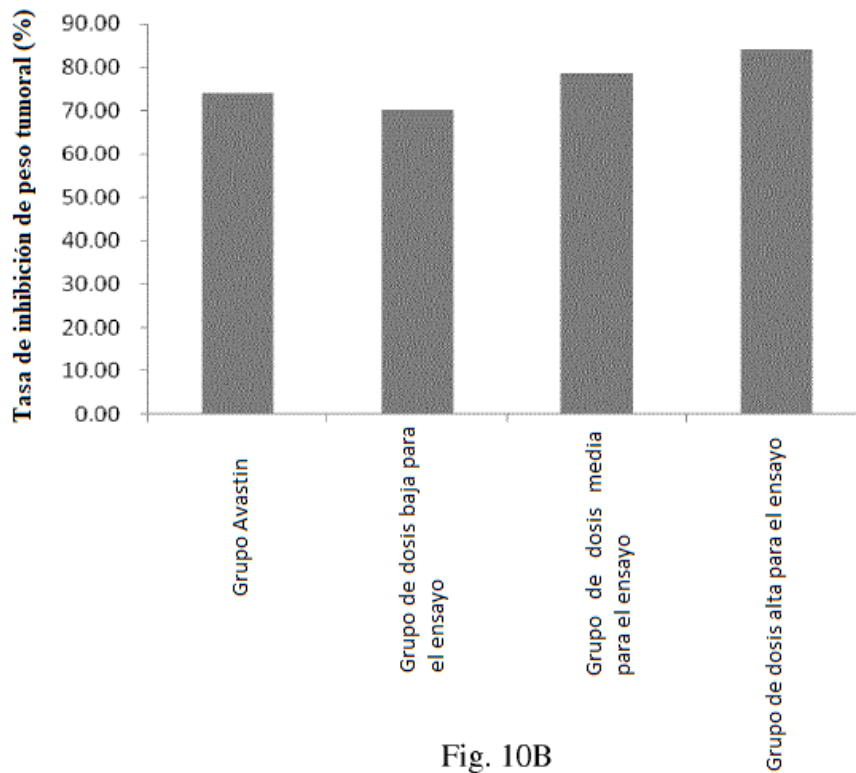
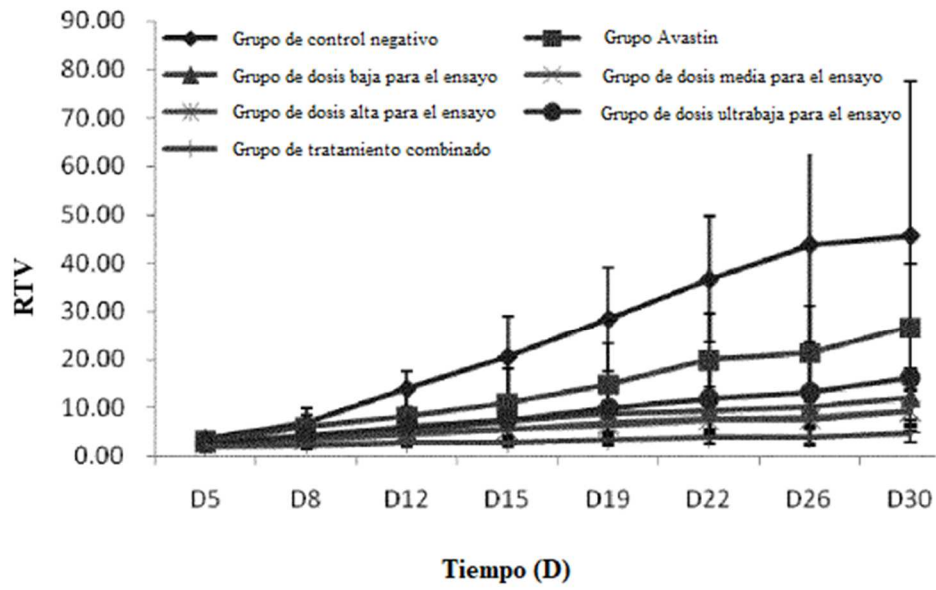


Fig. 10B



Tendencia de crecimiento de volumen tumoral relativa de cada grupo (HCT-8)

Fig. 11A

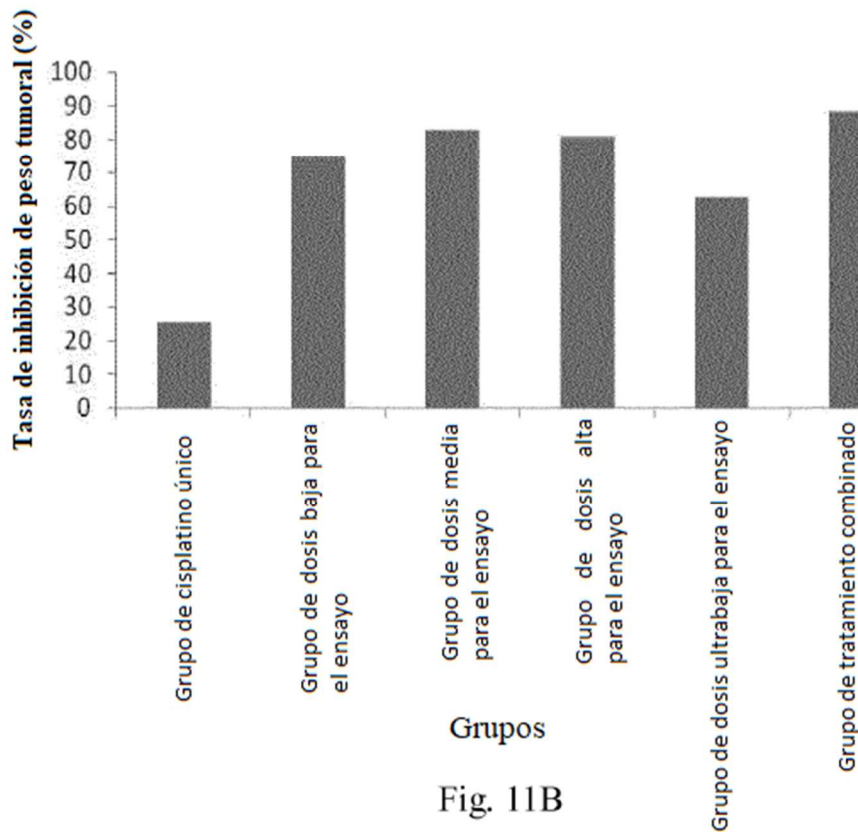


Fig. 11B