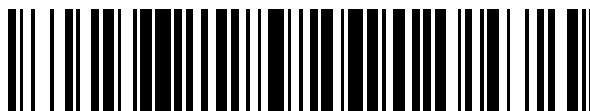


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 131**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2012** **PCT/US2012/067909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013** **WO13085972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2012** **E 12856569 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020** **EP 2788379**

54 Título: **Polipéptidos de unión beta del receptor PDGF**

30 Prioridad:

05.12.2011 US 201161566778 P
14.03.2012 US 201261610905 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.09.2020

73 Titular/es:

X-BODY, INC. (100.0%)
100 Beaver Street, Suite 101
Waltham, MA 02453, US

72 Inventor/es:

CHEN, YAN;
WAGNER, RICHARD, W. y
PAZMANY, CSABA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 784 131 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

Polipéptidos de unión beta del receptor PDGF

Introducción

- 5 El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un potente mitógeno y quimioatrayente en células de origen mesenquimatoso y está implicado en las patologías de muchas enfermedades. PDGF existe como un dímero unido por disulfuro que consiste en dos cadenas homólogas, A o B, que se pueden combinar para formar tres isoformas de PDGF distintas, AA, BB o AB. Todas las isoformas de PDGF median su efecto mitogénico al unirse a un receptor de PDGF de superficie celular (PDGFR).
- 10 Los receptores PDGF pertenecen a la familia de las tirosina quinasas y consisten en dos isoformas de receptores, alfa y beta. Las isoformas alfa y beta se pueden distinguir por sus especificidades de unión de ligando distintas, el receptor beta de PDGF se puede unir solo a la cadena B (isoformas BB y AB), mientras que el receptor alfa de PDGF se puede unir a todas las isoformas de PDGF.
- 15 La unión de PDGF a una superficie celular PDGFR provoca la dimerización del receptor y la transautofosforilación que, a su vez, produce eventos de señalización intracelular que causan, entre otras cosas, proliferación celular y migración celular. De acuerdo con lo anterior, los antagonistas de PDGFR que bloquean la unión de PDGF y/o la dimerización del receptor se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades asociadas con la activación de PDGFR.
- Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de nuevos antagonistas de PDGFR que se puedan usar para tratar enfermedades asociadas con la activación de PDGFR.
- 20 D1 (WO 2008/130704), por ejemplo, describe los anticuerpos humanos 1B3 y 2C5 obtenidos mediante el cribado de una biblioteca Fab humana naïve que reacciona específicamente con PDGFR β . D2 (Shen J. et al. (2007) Biochemical and Biophysical Research Communications 357: 1142-1147) y D3 (Shen J. et al. (2009) Neoplasia 11(6): 594-604) describen adicionalmente los anticuerpos 1B3 y 2C5.

Resumen de la invención

- 25 La invención es como se define en las reivindicaciones.
- Más particularmente, la invención se refiere a un polipéptido de unión aislado que consiste en un dominio pesado (VH) variable que se une específicamente a PDGFR β , en el que el dominio VH comprende secuencias de aminoácidos CDR3, CDR2 y CDR1, en el que
- 30 (i) la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, y la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 35 y en el que el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 321-324, o
- 35 (ii) la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, la CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25, y la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46 y en el que el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 345 y 360,
- y en el que el polipéptido de unión aislado se une al PDGFR β con un K_d de menos de 250 pM medido por resonancia de plasmón superficial, preferiblemente con un K_d de menos de 100 pM medido por resonancia de plasmón superficial.
- 40 La presente invención proporciona polipéptidos de unión que se unen específicamente a PDGFR β (por ejemplo, PDGFR β humano) con alta afinidad y antagonizan la activación de PDGFR β . Tales polipéptidos de unión son particularmente útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados a PDGFR β (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD)). La especificación también describe bibliotecas de polipéptidos de unión, composiciones farmacéuticas, así como ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de unión, vectores de expresión
- 45 recombinantes y células huésped para fabricar tales polipéptidos de unión. También se describen métodos de uso de polipéptidos de unión descritos en la especificación para detectar PDGFR β y para modular la actividad de PDGFR β .
- De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de unión aislado que consiste en un dominio VH, en el que, como dominio aislado, el dominio VH se une a un antígeno con un K_d de menos de 100 pM.
- 50 En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido de unión aislado que se une específicamente a PDGFR β , que comprende la secuencia CDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1.

- En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión consiste en un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos HCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1. El dominio VH comprende además un HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3 y 25, y un HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 35 y 46.
- 5 En ciertos aspectos, el polipéptido descrito en este documento comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos del dominio VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 318-368.
- 10 En ciertas realizaciones, el polipéptido consiste en un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 321-324 y 345 a 360.
- En ciertos aspectos de la divulgación, el polipéptido de unión comprende un dominio VL. El dominio VH descrito en este documento puede comprender además una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 63-147, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 148-232, y/o un LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 233-317.
- 15 En ciertos aspectos, el polipéptido descrito en este documento comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 80% (por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos del dominio VL seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 369-453.
- 20 En ciertos aspectos de la divulgación, el polipéptido descrito en este documento comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 369-453.
- En un aspecto adicional, la especificación describe un polipéptido de unión que se une al mismo epítipo en PDGFR β como un polipéptido de unión que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VH expuesta en SEQ ID NO: 318. En un aspecto adicional, el polipéptido de unión descrito en este documento comprende una secuencia de aminoácidos del dominio VH que comparte al menos un 80% de identidad de aminoácidos (por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) con una secuencia de aminoácidos del dominio VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 318-368.
- 25 En un aspecto adicional, la especificación describe un polipéptido de unión que compete por unirse a PDGFR β con un polipéptido de unión que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VH expuesta en SEQ ID No: 318. En un aspecto, el polipéptido de unión descrito en este documento comprende una secuencia de aminoácidos del dominio VH que comparte al menos un 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos del dominio VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 318-368.
- 30 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la invención inhiben la actividad de PDGFR β . En una realización, la actividad de PDGFR β se inhibe antagonizando la unión de PDGF a PDGFR β . En otra realización, la actividad de PDGFR β se inhibe antagonizando la dimerización de PDGFR β .
- 35 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la invención se unen a PDGFR β con una Kd de menos de 100 pM y/o con una tasa de disociación de menos de 10^{-3} s $^{-1}$.
- 40 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la invención se unen específicamente a PDGFR β de ratón y humano.
- En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la invención antagonizan la unión de PDGF al PDGFR β con una IC50 de menos de 5 nM, inhiben la fosforilación de la tirosina inducida por ligando de PDGFR β con una IC50 de menos de 4nM, inhiben la migración de pericito retiniano con una IC50 de menos de 6 nM, y/o tener una temperatura de fusión (Tm) de al menos 68 °C.
- 45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de unión de la invención.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de unión de la invención.
- 50 En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula huésped que expresa un polipéptido de unión de la invención.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de producción de un polipéptido de unión que se une específicamente a PDGFR β humano, que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar un polipéptido

de unión de la invención en condiciones tales que el polipéptido de unión que se une específicamente a PDGFR β humano es producido por la célula huésped.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de unión de la invención y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

- 5 En un aspecto, la especificación describe una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de unión de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno, preferiblemente una enfermedad o trastorno asociado a PDGFR β , en el que, preferiblemente, la enfermedad o trastorno es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o cáncer.

- 10 En un aspecto adicional, la especificación describe un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno, preferiblemente una enfermedad o trastorno asociado con PDGFR- β (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD o cáncer), el método que comprende administrar a un sujeto necesitando de los mismos una composición farmacéutica descrita en este documento.

- 15 En un aspecto adicional, la especificación describe una biblioteca diversa de dominios VH no emparejados en los que cada miembro de la biblioteca se une al PDGFR β humano. En un aspecto de la divulgación, cada miembro de la biblioteca comprende la secuencia de aminoácidos de CDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1 y la diversidad reside en las regiones FR1-FR3. En un aspecto adicional, la biblioteca es una biblioteca de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, una biblioteca de expresión de ADN).

- 20 En un aspecto adicional, la especificación describe una biblioteca diversa de pares VH/VL estables en la que cada miembro de la biblioteca se une al PDGFR β humano. En un aspecto, cada miembro de la biblioteca descrita en este documento comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1. En un aspecto, los dominios VL son dominios VL humanos. En un aspecto adicional, la biblioteca es una biblioteca de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, una biblioteca de expresión de ADN).

Breve descripción de los dibujos

- 25 La figura 1 es una representación esquemática de la construcción de bibliotecas de expresión de ácido nucleico de dominio VH de ejemplo para uso en los métodos descritos.

La figura 2 representa los resultados de los ensayos de unión *in vitro* que miden la unión al PDGFR β de humano o de ratón del dominio XB1511VH, una biblioteca de expresión de ADN barajado en marco/XB1511 CDR3 no seleccionado (R0) y un grupo de biblioteca de expresión de ADN barajado en marco/XB1511 CDR3 después de cuatro rondas de selección (R4).

- 30 La figura 3 es una representación esquemática de la construcción de bibliotecas de expresión de ácido nucleico VL de ejemplo para uso en los métodos descritos.

La figura 4 representa los resultados de los ensayos ELISA que miden la unión al PDGFR β humano de XB1511/VL scFv que comprende dominios VL aislados del grupo de cribado de segunda ronda de una criba de expresión de ADN de emparejamiento de VH/VL.

- 35 La figura 5 representa los resultados de los ensayos ELISA que miden la unión al PDGFR β humano de XB1511/VL scFv que comprende dominios VL aislados del grupo de cribado de la tercera ronda de una criba de expresión de ADN de emparejamiento de VH/VL.

- 40 La figura 6 representa los resultados de los ensayos ELISA que miden la unión al PDGFR β humano de XB2202/VL scFv que comprende dominios VL aislados del grupo de cribado de segunda ronda de una criba de expresión de ADN de emparejamiento de VH/VL.

La figura 7 representa los resultados de los ensayos ELISA que miden la unión al PDGFR β humano de dominios VL no emparejados de XF1511/VL scFv que se muestra en la figura 9.

- 45 La figura 8 representa los resultados de los estudios de afinidad de unión a la solución que miden la unión al PDGFR β humano del dominio VH XB1511 marcado con ^{35}S Met y scFv que contiene XB1511 obtenido de cribas de expresión de ADN de emparejamiento de VH/VL.

La figura 9 representa los resultados de los estudios de afinidad de unión a la solución que miden la unión al PDGFR β humano del dominio VH XB2202 marcado con ^{35}S Met y scFv que contiene XB2202 obtenido de cribas de expresión de ADN de emparejamiento de VH/VL.

- 50 La figura 10 representa los resultados de los ensayos de unión de competición por resonancia de plasmón superficial que miden la cinética de unión de PDGF-BB a PDGFR β a diversas concentraciones de XB2202.

La figura 11 representa los resultados de ensayos de unión de resonancia de plasmón superficial que miden la cinética de unión de XB2202 a PDGFR β humano (A) y de ratón (B).

La figura 12 representa los resultados de ensayos de unión de resonancia de plasmón superficial que miden la cinética de unión de XB2708 a PDGFR β humano (A) y de ratón (B).

- 5 La figura 13 representa los resultados de los estudios de unión de resonancia de plasmón superficial que miden la cinética de unión de XB1511 y los derivados barajados en marco XB2202 y XB2708 a PDGFR β humano.

La figura 14 representa los resultados de los ensayos de migración celular *in vitro* que miden la inhibición de la migración de pericitos por XB2708.

- 10 La figura 15 representa los resultados de ensayos de migración sin etiqueta que miden la capacidad de una IgG1 que contiene XB1511 para inhibir la migración de fibroblastos de prepucio humano.

La figura 16 representa los resultados de los ensayos ELISA que miden la unión al PDGFR β humano del dominio VH XB2202 y XB2202/A4 scFv después de la incubación a diversas temperaturas.

Descripción detallada

- 15 La presente invención proporciona polipéptidos de unión que se unen específicamente a PDGFR β (por ejemplo, PDGFR β humano) con alta afinidad e inhiben la actividad de PDGFR β . Tales polipéptidos de unión son particularmente útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados a PDGFR β (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD)). La invención también proporciona bibliotecas de polipéptidos de unión, composiciones farmacéuticas, así como ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de unión, vectores de expresión recombinantes y células huésped para fabricar tales polipéptidos de unión. También se describen métodos de uso
20 de polipéptidos de unión de la invención para detectar PDGFR β y para modular la actividad de PDGFR β .

I. Definiciones

Para que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos

- 25 Como se usa en este documento, el término "PDGFR β " se refiere al receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de PDGFR β son bien conocidas en la técnica. Una secuencia de ejemplo de PDGFR β amino humano se expone en el depósito GenBank GI: 4505683 y una secuencia de ejemplo de PDGFR β amino de ratón se expone en el depósito GenBank GI: 226371752.

- 30 Como se usa en este documento, el término "PDGF" se refiere al factor de crecimiento derivado de plaquetas. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de PDGF son bien conocidas en la técnica. Se establece una secuencia de amino PDGF humano de ejemplo en el depósito GenBank GI: 4505681 y se expone una secuencia de amino PDGF de ratón de ejemplo en el depósito GenBank GI: 400744.

- 35 Como se usa en este documento, el término "polipéptido de unión" se refiere a un polipéptido que contiene todo o parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, todo o parte del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera, por ejemplo, al menos HCDR3 del dominio variable de la cadena pesada) de modo que el polipéptido de unión reconozca específicamente un antígeno diana. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de unión incluyen anticuerpos, o fragmentos de los mismos, y dominios similares a inmunoglobulinas (por ejemplo, dominios de fibronectina) que se han alterado para comprender todo o parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

- 40 Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH abreviada) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL abreviada) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionales en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones
45 que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR).

- 50 Como se usa en este documento, el término "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar apropiada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente constantes del anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de porciones de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii)

fragmentos de Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de cadena sencilla Fv(scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR)). Otras moléculas modificadas, tal como los diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están incluidos dentro de la expresión "parte de unión al antígeno".

Como se usa en este documento, los términos "dominio VH" y "dominio VL" se refieren a dominios pesados y ligeros variables de un solo anticuerpo, respectivamente, que comprenden FR (regiones marco) 1, 2, 3 y 4 y CDR (regiones determinantes complementarias) 1, 2 y 3 (véase Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda).

Como se usa en este documento, el término "FR1-FR3" se refiere a la región de un VH que abarca FR1, CDR2, FR2, CDR2 y FR3, pero excluye las regiones CDR3 y FR4.

Como se usa en este documento, el término "no apareado" se refiere a VH o VL que no están unidos (ya sea covalentemente o no covalentemente) a un dominio VL o VH complementario, respectivamente.

Como se usa en este documento, el término "dominio VL o VH complementario" se refiere a un dominio VL o VH que se asocia con un dominio VH o VL, respectivamente, para formar un par VH/VL.

Como se usa en este documento, el término "par VH/VL" se refiere a un dímero no covalente de un solo VH y un único dominio VL, en el que los dominios VL y VH están asociados de una manera similar a la observada de forma completa, la molécula de inmunoglobulina tetramérica y el dímero pueden unirse específicamente a al menos un antígeno diana. Un "par VH/VL estable" es un par VH/VL que no exhibe una disociación significativa de los dominios sustituyentes VH y VL en condiciones fisiológicas.

Como se usa en este documento, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) y Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen para comparación. Preferiblemente, el término "CDR" es un CDR como se define por Kabat, en base a comparaciones de secuencia.

Como se usa en este documento, el término "residuos de aminoácidos marco (FR)" se refiere a aquellos aminoácidos en la región marco de una cadena de inmunoglobulina. El término "región marco" o "región FR" como se usa en este documento, incluye los residuos de aminoácidos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (por ejemplo, usando la definición Kabat de CDR).

Como se usa en este documento, el término "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un polipéptido de unión para unirse a un antígeno con un Kd de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o más, y/o se unen a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno inespecífico. Sin embargo, se debe entender que los polipéptidos de unión son capaces de unirse específicamente a dos o más antígenos que están relacionados en secuencia. Por ejemplo, los polipéptidos de unión de la invención se pueden unir específicamente a PDGFR β humano y no humano (por ejemplo, ratón o primate no humano).

Como se usa en este documento, el término "antígeno" se refiere al sitio de unión o epítipo reconocido por un polipéptido de unión.

Como se usa en este documento, el término "biblioteca de expresión de ácido nucleico" se refiere a cualquier expresión vinculada a fenotipo genotipo *in vitro* libre de células reconocida en la técnica, que incluye, sin limitación, las expuestas en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,195,880; 6,951,725; 7,078,197; 7,022,479; 6,518,018; 7,125,669; 6,846,655; 6,281,344; 6,207,446; 6,214,553; 6,258,558; 6,261,804; 6,429,300; 6,489,116; 6,436,665; 6,537,749; 6,602,685; 6,623,926; 6,416,950; 6,660,473; 6,312,927; 5,922,545; y 6,348,315, y en el documento WO2010/011944.

Como se usa en este documento, el término "vector" pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Adicionalmente, ciertos vectores son

capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Como se usa en este documento, el término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que este término pretende referirse no solo a la célula sujeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a ya sea mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento.

Como se usa en este documento, el término "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en este documento. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración a un sujeto, una parte de unión al antígeno o anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a PDGFR β (por ejemplo, AMD) o predispuesto a tener dicha enfermedad o trastorno, para prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

Como se usa en este documento, el término "enfermedad o trastorno asociado a PDGFR β " incluye estados de enfermedad y/o síntomas asociados con la actividad de PDGFR β . Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con PDGFR β incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y cáncer.

Como se usa en este documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de un polipéptido de unión que es suficiente para efectuar el tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado a PDGFR β , como se describe en este documento, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo del sujeto y la condición de la enfermedad que se está tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, la forma de administración y similares, que puede determinar fácilmente un experto en el arte. Las dosis para la administración pueden variar, por ejemplo, desde aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10,000 mg, de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 5,000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1,000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, de un polipéptido de unión de acuerdo con la invención. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz también es aquella en la que los efectos beneficiosos minimizan y/o compensan los efectos tóxicos o perjudiciales (esto es, efectos secundarios) de un polipéptido de unión.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

Como se usa en este documento, el término "resonancia de plasmón superficial" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Como se usa en este documento, el término " K_D " se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción de polipéptido/antígeno de unión particular.

Como se usa en este documento, el término "tasa de disociación" se refiere a la velocidad de disociación (K_{off}) para una interacción de polipéptido/antígeno de unión particular.

Como se usa en este documento, el término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con el sitio de unión al antígeno específico en una molécula de unión de la invención. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo. De este modo, diferentes anticuerpos se pueden unir a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítipos pueden ser ya sea conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos.

II Polipéptidos de unión

En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos de unión que consisten en un dominio VH, en el que, como un dominio aislado, el dominio VH se une a un antígeno con un K_D de menos de aproximadamente 200 pM (por ejemplo, aproximadamente 200, 190, 180, 175, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 40, 30, 20, 10, 5, o 1 pM o menos).

En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos de unión que se unen específicamente a PDGFR β e inhiben la actividad de PDGFR β . Tales polipéptidos de unión son particularmente útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados a PDGFR β (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad o AMD).

En general, los polipéptidos de unión a PDGFR β de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que se une específicamente a PDGFR β . Una secuencia HCDR3 no limitante apropiada para su uso en los polipéptidos de unión de la invención es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 1 (HGGDRSY). En otros aspectos de la divulgación, la secuencia de CDR3 de la cadena pesada es una variante de la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos una (por ejemplo, una, dos o tres) sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a la SEQ ID NO: 1.

Se puede usar cualquier polipéptido de unión que pueda incorporar una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada que se una específicamente a PDGFR β (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1 (HGGDRSY)) en los polipéptidos de unión descrito en este documento que incluye, sin limitación, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y dominios de tipo inmunoglobulina. Los dominios de tipo inmunoglobulina apropiados incluyen, sin limitación, dominios de fibronectina (véase, por ejemplo, Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109), DARPin (véase, por ejemplo, Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701), dominios Z de proteína A (véase, Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668-76), Lipocalins (véase, por ejemplo, Skerra et al. (2008) *FEES J.* 275 (11): 2677-83), Affilins (véase, por ejemplo, Ebersbach et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1): 172-85), Affitins (véase, por ejemplo, Krehenbrink et al. (2008). *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-), Avimers (véase, por ejemplo, Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556-61), Fynomers, (véase, por ejemplo, Grabulovski et al. (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196-), y péptidos de dominio Kunitz (véase, por ejemplo, Nixon et al. (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2): 261-8).

En un aspecto de la divulgación, los polipéptidos de unión a PDGFR β son anticuerpos, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un dominio VH y/o un dominio VL. Se muestran de ejemplo de secuencias de aminoácidos de CDR, VH y VL apropiadas para su uso en el contexto de la invención se exponen en las tablas 1-4. De acuerdo con lo anterior, en ciertos aspectos, los polipéptidos de unión pueden comprender HCDR3 (SEQ ID NO: 1) junto con secuencias HCDR2 y/o HCDR1 que se seleccionan independientemente de una cualquiera de las secuencias de cadena pesada HCDR2 o HCDR1 expuestas en la tabla 1. En ciertos aspectos, los polipéptidos de unión descritos en este documento pueden comprender además CDR de cadena ligera que se seleccionan independientemente de cualquiera de las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 o CDR3 expuestas en la tabla 2. Por ejemplo, el polipéptido de unión de la divulgación puede comprender uno cualquiera de los dominios variables de cadena pesada (VH) expuestos en la tabla 3, opcionalmente emparejados con uno cualquiera de los dominios variables de cadena ligera (VL) expuestos en la tabla 4.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de anticuerpos anti-PDGR β de ejemplo

Nombre del clon	CDR3	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.
XB1511	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	SYAIS	33
G2	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	GYAIS	34
XB2202	HGGDRSY	1	GILPILKTPNYAQRFQG	3	RHAIS	35
C05.	HGGDRSY	1	GVLPILKTPNYAQRFQG	4	RHAIS	35
E2.	HGGDRSY	1	WINPNSGNTGYAQKFQG	5	DYYIQ	36
A3.	HGGDRSY	1	WINPNSGGTYFAQKFQG	6	DYYIQ	36
C3.	HGGDRSY	1	GILPILKTPNYAQRFQG	3	DYYIQ	36
F10.	HGGDRSY	1	WINPDSGGTYFAQKFQG	7	DYYIQ	36
C12.	HGGDRSY	1	WMNPDSGGTYAQKFQG	8	DYYIQ	36
H2.	HGGDRSY	1	WINPNSGDTHSAQKFQG	9	AYYIQ	37
B1.	HGGDRSY	1	WINPNSGNTTYAQKFQG	10	DYYIH	38
E11.	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	DYYIH	38
H1.	HGGDRSY	1	WINPNSGGTNSAPKFQG	11	DYHLH	39
E6.	HGGDRSY	1	WINPNSGGTNYAQKFQG	12	DYYLH	40
A1.	HGGDRSY	1	WIVVSGGNTNYAQKFQE	13	SSAVQ	41
H7.	HGGDRSY	1	WIVVSGGNTNYAQKFQE	13	SSAMQ	42
G04.	HGGDRSY	1	WIVVSGGNTNYAQKFQE	13	SYAIS	33
B2.	HGGDRSY	1	VINTGVGSTNYAQKFQG	14	NYQVQ	43
A7.	HGGDRSY	1	VINTGVGSTNYAQKFQG	14	NYPVQ	44
H3.	HGGDRSY	1	LSNPBGDTTVYAPKFQG	15	NSFMQ	45
B4.	HGGDRSY	1	LSNPBGDTTVYAPKLQG	16	NSFMQ	45
D06.	HGGDRSY	1	VISYDGSNKYYADSVKG	17	SYGMH	46
F3.	HGGDRSY	1	WISADNGNTNYAQKFQE	18	SHGMS	47
A12.	HGGDRSY	1	WISADNGNTKYAQKFQD	19	SHGMS	47
G3.	HGGDRSY	1	GFDPEDGETTYAQKFQG	20	ELSMH	48
H12.	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	DNYVH	49
G12.	HGGDRSY	1	GIIPVSGTTPNYAQKFQG	21	AYPIS	50
C06.	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	GHYIH	51
C11.	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	NDYIH	52
F08.	HGGDRSY	1	GIIPFGTANYAQKFQG	2	SSYIH	53
E9.	HGGDRSY	1	ITYPADSTTVYSPSFQG	22	NYWIG	54
E11.	HGGDRSY	1	RINNDGSSTSYADSVKG	23	SYWMH	55
C08.	HGGDRSY	1	RISIDGTTTTYADSVQG	24	AFWMH	56
XB2708	HGGDRSY	1	FILPDGNNKYYADSVKG	25	SYGMH	46
D03.	HGGDRSY	1	RINADGTSTAYAESVKG	26	NDWMH	57
A10.	HGGDRSY	1	LIYSDGSTYYADSVKG	27	DYAMN	58
C09.	HGGDRSY	1	AIDGSGGTTYAGSVKG	28	NNAMS	59
A06.	HGGDRSY	1	HISNDGSITRYADSVKG	29	GHWMH	60
C05.	HGGDRSY	1	RIKTDGSSTSYADSVKG	30	SNWMH	61
H01.	HGGDRSY	1	RISSDGSTTAYADSVRG	31	SDWMH	62
G07.	HGGDRSY	1	RISSDGSSTAYADSVKG	32	SDWMH	62

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de anticuerpos anti-PDGR β de ejemplo

Nombre del clon	CDR3	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.
B10.	HQSSSLPWT	63	AYQSVS	148	RASQTIGSTLH	233
H10.	HQSSSLPHT	64	SSQSFS	149	RASQSIGSSLH	234
F10.	RASQSIGSGLH	65	ASQSMS	150	HQSSSLPWT	235
B12.	HQTSSLPLT	66	ASQPFS	151	RASQSIGIKLH	236
B11.	QQYGSSPWT	67	GASSRAS	152	RASQSVSSNYLA	237
E7.	QQYGSSPQT	68	GASSRAT	153	RASQSVSSSYLA	238
E8.	QQYGSSPPYT	69	GASSRAT	154	RASQSVSSSYLA	239
H8.	QQYAGSPFT	70	GASSRAT	155	RASQSVSSNYLA	240
H12.	QQFGSSPWT	71	GASRRAT	156	RASQSVRSSYVA	241
F8.	QQYGSSPLT	72	VASRRVT	157	SGGRSNIGGNAVN	242
D11.	QQYGASPRT	73	GASSRAT	158	RASQNITSNFFA	243

G8.	QQYGSALLT	74	DASNRAA	159	RASQSLSGTYLA	244
H9.	QQYGNSWT	75	RASTRAT	160	RASEDIYNNYLA	245
H11.	HQSRNLPT	76	ASQSFS	161	RASQSIGSSLH	246
G12.	HQSRSPPLT	77	SSQSSIS	162	RASESIGTALH	247
E11.	QQYETSWT	78	RASTRAT	163	RTSQILHSQYLA	248
F12.	RDGLNHLV	79	GNNRPS	164	QGDTRLTCYAS	249
C8.	GTWSSSLSVVI	80	YDNYQRFS	165	SGSTSNIGKNFVS	250
A8.	HQTGSFPYT	81	LASQSFS	166	RASRYIGSNLH	251
B8.	LLSYSGPRVV	82	DTSNKQS	167	GSSTGAVTSGHSFF	252
F7.	QQSYRTFVS	83	WASTRES	168	KSSXSLLYRSNNKNYL A	253
B7.	QVWDSSSVI	84	RDSNRPS	169	GGANIANKNVH	254
G9.	KSRDSSAMRWV	85	GKDNRPS	170	QGDSLRTYYAS	255
A9.	LLYFNPTRV	86	DTHNRHS	171	GSSTGAVTSGHYFY	256
A11.	GADHGRV	87	GIVGSKGD	172	TLSSGYSNYKVD	257
E12.	QVWHSGVI	88	FDSRPS	173	GGNNIGSKSVH	258
H7.	HQSRSSHT	89	YASQSFS	174	RASQNIQNSLH	259
A10.	QSFVVSHEVV	90	GNNQRPS	175	TRCTGNIASHFVQ	260
C11.	MQSTHFPPT	91	EVSKRFS	176	KSSQSLNSDDGKTYL Y	261
D10.	QQYDSFPWT	92	DASHLEA	177	QASHDISNYLN	262
D12.	QQHDTSQWT	93	GASSRAA	178	RASQSVSRTYLA	263
C7.	MQGLHIPHT	94	EVSGRFS	179	KSSQSLHSDGKTHLF	264
D7.	MQSTHQWT	95	SVSKRDS	180	RSSHSLVHSDGNIYLN	265
C9.	QQYDSYSRT	96	EASRLES	181	RASQSISSWLA	266
C12.	QQSFSMRT	97	GASGLQS	182	RTSQGIRNYLS	267
D8.	QQYVNSRT	98	DASNRT	183	RASQSVTSNYLA	268
D9.	QQYNDFFT	99	GASTRAT	184	RASQSVSSKLA	269
G7.	MQATQFVS	100	KISNRMS	185	RSSSPVHSDGNIYLS	270
G11.	QQYGDVFT	101	GGIRAS	186	RASQSVSSRNLA	271
F9.	QQSYSTPT	102	AASLTHY	187	RASDNIGNYLN	272
E9.	QESYSTLLYT	103	AASRLQS	188	RASESISNYLN	273
B1.	QWESGSEHYV	104	DDSDRPS	189	GGNNIGYDSVH	274
E6.	QVWESTSDHPT	105	YDNDRPS	190	GGNNIGATTV	275
F3.	QVWDSSSDHWV	106	YDSRPS	191	GGNNIGSKSVH	276
H4.	QVWDSSSGHRGV	107	DDSDRPS	192	GGNNIVSKGVH	277
H5.	QVWDSATDHVV	108	SDRDRPS	193	GGNNLGSKIVH	278
B5.	QVWDSDRHHVV	109	DDYGRPS	194	AGNNIGKSVQ	279
G6.	QVWDINDDYAV	110	QDTKRPS	195	SGDNLGHTNAC	280
C1.	QQYVSSPPMYT	111	GASSRAT	196	TASQSVSSTYLT	281
F1.	QQYVTTYPLT	112	GASNLEG	197	RASQNIIDYDLA	282
A3.	QQYDSVPLT	113	GASTLES	198	QASQVIDKYVN	283
B4.	QQYEDLPSP	114	EASNLET	199	QASQDIFHYLN	284
B6.	QQYGSFPYS	115	AASNRT	200	RASQSPGSNYLA	285
F2.	QQYQNPPPT	116	GASNLER	201	QASQFIHIYLN	286
D3.	QQYKTFPHT	117	AASYLQT	202	RASQDVGIYVA	287
G2.	QQYHSYPYT	118	KVSTLES	203	RASQDINTWLA	288
A4.	QQYNNVLRT	119	EASNLET	204	QASQDISNWLN	289
G4.	QQYNKWPTF	120	GASTRAT	205	RVSQNVFSDLA	290
D5.	QQYNNWPPWT	121	AASLTHY	206	RASDNIGNYLN	291
A1.	QQRSNGVTF	122	EASTRAT	207	RASQSVSSFLA	292
H2.	QHYHTYPT	123	QASSLKT	208	RATESISIWLA	293
E2.	QQYYLTPTFTVT	124	WASTRES	209	KSSQSVLYSSNNKNYL A	294
F4.	QQTNTFPLT	125	RATNLQS	210	RASQDISSWLA	295
C5.	QQYHTTPT	126	WASTRES	211	KSSQSVLYSSNNRNYL A	296
E5.	QQSFSSPWT	127	AASNLOS	212	RASQTFTHLN	297
F6.	QQSFTTLVT	128	SASTLOS	213	RASQSVNVYLN	298
G5.	QQQFNSYPLS	129	DASTLQT	214	RASQDISSSLA	299

A5.	GADHSGSGSNLVYV	130	VGTGGIVGSRG D	215	TVSSGYRSYEVD	300
D6.	GADHSGSGSDFVYV	131	VGTGGIVGSRG D	216	TLSSDYSSYNVD	301
E4.	AAWDDSLNGPV	132	TNNQRPS	217	SGSSTNIGSNAVN	302
F5.	AAWDDRLSGPV	133	TTDRRPS	218	SGGGSNIGSNFGY	303
G1.	ATWDDDLNPKWV	134	TNNQRPS	219	SGSSSNIGSNSVD	304
E3.	MQALQTSWT	135	LGSNRAS	220	RSSQSLHLSNGYNFLD	305
A2.	MQGTHWPYT	136	QVSTRDS	221	CDDTVSTLPAHP	306
D1.	MQSRNLPKT	137	EASSRPS	222	KSSQSLVHRDGKTYLY	307
C4.	MVWYSANV	138	RSDSDRHQGS	223	TLSSGFNVVSYNIY	308
E1.	HVLDSSTIVI	139	RDTNRPS	224	AGNNIGTYVH	309
A6.	HQYNNWPLYT	140	GASTRAT	225	RASQSVSSNLA	310
H1.	NSRDSSGYLLL	141	GKNTRPS	226	QGDSLRTYYAS	311
B2.	LLSYSGAGV	142	DASNKHS	227	GSSTGAVTSGHYPY	312
C2.	LQDYSFPYT	143	DSSTLQS	228	RPSQDIGTDLG	313
G3.	QAWDSSHAV	144	QDTKRPS	229	SGDELKYKYTC	314
H3.	QSEDSRGPV	145	KDTERPS	230	SGSTFPKLYSF	315
D4.	VQATHFPVT	146	KISNRPS	231	RSESVVHDDGNTYLS	316
C6.	CSYTTGSTLYL	147	DVNRPS	232	TGTSDDVGRYDYS	317

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de (VH) de dominio variable de cadena pesada de anticuerpos anti-PDGFR β de ejemplo

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
	Secuencias de selección primaria de VH en PDGFR β humano recombinante	
A4 XB1511	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIISWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAI HGGDRSYWGQGTLLTVSS	318
B4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAI HGGDRSYWGQGTLLTVSS	319
G2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTGYAISWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAI HGGDRSYWGQGTLLTVSS	320
	(XB1511) barajado en marco y seleccionado con 2 rondas en PDGFR β diana humano y 2 rondas en ratón	
XB2202	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSRHAIISWVRQAPGQGLEWIG GILPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	321
C4.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSRHAIISWVRQAPGQGLEWIG GILPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSGLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	322
B12.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSRHAIISWVRQAPGQGLEWIG GILPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	323
D07.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSRHAIISWVRQAPGQGLEWIG GILPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	324
C05.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSRHAIISWVRQAPGQGLEWIG GVLPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	325
E05.	QVQLVQSGPKVKKPGSSVRVSKASGGTFSRHAIISWVRQAPGQGLEWIG GILPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	326
E2.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYFTDYIYQWVRQAPGQGLEWVG WINPNSGNTGYAQKFPQGRVTIMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGTLLTVSS	327
A3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYFTSDYIYQWVRQAPGQGLEWVG WINPNSGGTYFAQKFPQGRVTIMTRDTSISTAYMELSSLTSDDTAVYYCAT HGGDRGYWGQGTLLTVSS	328

C3.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG GILPILKTPNYAQRFPQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	329
F10.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG WINPDSGGTYFAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	330
C12.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG WMNPDSGGTYFAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	331
H2.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG WLNPNSSGDTHTSAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	332
F11.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG WLNPNSSGDTHTSAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	333
B1.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG WINPNNGNTTYAQQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	334
E11.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQGLEWIG GIIPIFGTANYAQQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	335
H1.	EVQLLESQAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WINPNSSGDTHTSAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	336
E6.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WINPNSSGDTHTSAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	337
A1.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WIVVSGGNTNYAQQKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	338
H7.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WIVVSGGNTNYAQQKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	339
G04.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WIVVSGGNTNYAQQKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	340
B2.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG VINTGVGNTNYAQQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	341
A7.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG VINTGVGNTNYAQQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	342
H3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG LSNPSSGDTTYAPKQFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	343
B4.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG LSNPSSGDTTYAPKQFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	344
H05.	EVQLVQSGGGVVPQGGSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA FILFDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	345
D06.	QVQLVQSGGGVVPQGGSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	346
F3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WISADNGNTNYAQQKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	347
A12.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQGLEWIG WISADNGNTNYAQQKFQGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	348
G3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGKGLEWIG GFDPEGETIYAQQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	349
F05.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYLHWVRQAPGKGLEWIG GFDPEGETIYAQQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTVTVSS	350

H12.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDNYVHWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKPKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	351
G12.	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGAFNAYPISWVRQAPGQGLEWMG GIIPVSGTANYAQKPKQGRVTITADKSTYTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	352
C06.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCMASGYTFTGHYIHWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKPKQGRVTITADESTSTAYTELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	353
C11.	QVQLVQSGAAVKKPGASVKVSRKASGYTFTNDYIHWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKPKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	354
F08.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYIHWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKPKQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	355
E9.	QVQLVESGAEVKPKGESLQISCKASGYRFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMG ITYPADSTTVYSPFQGGVTISADKSISTVFLQWSSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	356
E11.	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVS RINNDGSSTSYADSVKGRFTISRDTAKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	357
H11.	QVQLLESAGAEVKNPGASVKVSCKASGYPPSAYYIQWVRQAPGQGLEWMG WLNPNSGDTHSAQKPKQGRVTMTSDTSISTAYMELSGLTSDDTAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	358
C08.	EVQLLESBGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSFNAFWMHWRQAPGKGLEWVS RISIDGTTTTYADSVQGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	359
	(XB1511) barajado en marco y seleccionado con PDGFR β humano y selección de tasa de disociación	
XB2708	QVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA FILFDGNNKYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	360
D03.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCVASGFTFGNDWMHWVRQAPGKGLVWVS RINADGTSTAYAESVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	361
A10.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMNHWVRQAPGKGLEWVS LIYSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCATH GGDRSYWGQGLTLTVSS	362
C09.	QVQLVQSGGALVQPGGSLRLSCAASGFTLSNNAMSWVRQAPGKRLWVS AIDSGSGTTYAGSVKGRFTISSDNSKNTVFLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	363
A06.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGHWMHWVRQVPGKGLVWVS HISNDGSITRYADSVKGRFTVARDNAKNTMYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	364
C05.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNWMHWVRQVPGKGLEWVS RIKIDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	365
H01.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSDMHWVRQAPGKGLVWVS RISSDGSSTAYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	366
G04.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSDMHWVRQAPGKGLVWVS RISSDGSSTAYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	367
G07.	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDMHWVRQAPGGLVWVS RISSDGSSTAYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNSLRSEDVAVYYCAT HGGDRSYWGQGLTLTVSS	368

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos (VL) dominio variable de cadena ligera de anticuerpos anti-PDGFR β de ejemplo

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VL	SEQ ID NO.
	Secuencias de PR2 VL a partir de emparejamiento de XB1511	
B10.	QSVLTQSPDLQSVTPREKLTITCRASQTIGSTLHWYQQKPGQSPRLVIKY AYQSVSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTITGLEAEDAATYYCHQSSSLPWTFGQ GTKLTVL	369
H10.	QSVLTQSPDFQSVSPKDKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPGQSPKLLIKY SSQSFSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTITGLEAEDAATYYCHQSSSLPHTFGQ GTKVTVL	370
F10.	QSVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSGSLHWYQQKPGQSPKLLIKY ASQSMGVPSPRFRSGSGSGTDFLTISRLEVEDAAMYYCHQSSSLPWTFGQ GTKVTVL	371
B12.	QSVLTQSPDFQSVTPKQNVFTTCRASQSIGIKLHWYQQKPDQSPKVLIKY ASQPFSGVPSRFRSGSGSGTDFLTITNSLEAEDAATYYCHQTSLLPLTFGG GTKVTVL	372
B11.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPVRVSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPWTFG QGTKLTVL	373
E7.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPQTFG QGTKLTVL	374
E8.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPPYTF QGTKLTVL	375
H8.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYAGSPFTFG PGTKLTVL	376
H12.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSVSSYVWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYHCQYQSSPWTFG QGTKLTVL	377
F8.	QSVLTQSPASGTPQQRVTISCSGGRSNIGGNVWYQQKPGQAPRLLIH VASRRVTGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAIYYCQYQSSPLTFG GGTKLTVL	378
D11.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQNTSNFFAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRISGSGSGTDFLTISRLEPEDFALYYCQYQSSPRTFG QGTQLTVL	379
G8.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASQSLSGTYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRAAGIPKRFSGSGSGRTDFLTISRVDPADSAVYYCQYGSALTFG GGTKVTVL	380
H9.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASEDYNNYLAWYQHKGQPPRLLIY RASTRATGIPTRFSGSGSGRDFVLTINRLEPEDFAVYYCQYQNSWTFGQ GTKLTVL	381
H11.	QSVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLITF ASQSFSGVPSRFRSGSGSGTDFLTITNSLEAEDAATYYCHQSRNLPFTFGP GTKLTVL	382
G12.	QSVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASESIGTALHWYQQKPDQSPKLLIKY SSQSIGVPSRFRVGRGSETEFTLTITNSLEAENAATYYCHQSRSPPLTFGQ GTQLTVL	383
E11.	QSVLTQSPGTLSSPGERATLSCRTSQILHSOYLAWYQQKRGQAPRLLIY RASTRATGIPERFSGSGSGRDFVLTISRLEPEDSAVYYCQYQTSWTFGQ GTKVTVL	384
F12.	QSVLTQDFVVSVALGQTVRITCQGDTLRTCYASWYQQRPRQAPILVIYGE NNRPSGIPARFSGSSSGSTASLTITGAQAEDEGDYYCHCRDGLNHLVFGG GTKVTVL	385
C8.	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSGSTNIGKNFVSWYQHLPGTAPKLLIY DNYQRFSGIPDRFSGGKSGTSATLSITGLQTADEADYYCGTWDSLSVVI FGGGTKLTVL	386
A8.	QAGLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASRYIGSNLHWYQQKPDQPPKLLIKL ASQSFSGVPSRFRSGSGSGTDFLTITNGLEAEDAATYYCHQTSFPYTFGQ GTKLTVL	387
B8.	QAVLTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGHSFFWFQQRPGQAPRTLI YDTSNKQSWTPARFSGSLLGGKAALTLGSAQPEDEAEYYCLLSYSGPRVV FGGGTKVTVL	388

F7.	QAVVTQSPDSLAVSLGERATISCKSSXSLLYRSNNKNYLAWYQQKPGQPP RLLISWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIVSRLRAEDAAVYCCQSYRT PFSFGPGTKVTVL	389
B7.	SYVLTQPLSVSVALGQTARISCGGANIANKNVHWYQLQPGQAPVLVIYRD SNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTITRAQARDEADYYCQVWDSSSVIIGGG TKVTVL	390
G9.	SYVLTQDPAVSVAGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYRQKPGQAPVLVIFYGK DNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSAMRWVFG GGTKLTVL	391
A9.	NFMLTQEPSTLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGHYPPYFQKPGQVPRTFI YDTHNRHSWTPVRFSGSLFGGKAALTLGAQPEDEAEYCYLLYFNPTRVF GGGTCLTV	392
A11.	NFMLTQPPSASASLGASVTLTCTLSGYSNYKVDWYQQRPGKGRFVVRV GTGGIVGSKGDGIPDRFSGVLSGLNRYLTIKNIQEEDES DYHCGADHGRV FGGTCLTVL	393
B12.	QPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYHLRPGQAPVLVIYFD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWHSQVIFGGGT KLTVL	394
H7.	QPVLTQSLDFQSVTPKEKVTITCRASQNIQNSLHWYQKPNQSPKVLIKY ASQSFSGVPSRFSGSGFGTDFTLTINSLEPEDAATYYCHQSRSSHTFQGG TKLTVL	395
A10.	EIVLTQSPGNLSLSPGERATLSCTRCTGNIAHFVQWYQQRPGSSPTTVI FGNNQRPQGVSDRFSGSIDSSNSASLTISRLEKTEDEADYYCQSFQVYSH EVVFGGTCLTVL	396
C11.	QTVVTQTPVLSLVTGQPASISCKSSQSLNDDGKTYLYWYLRPGQPP HLLIYEVSQRFSRFSGSGFGTDFTLRISRVEADVGVPYCMQSTHF PFTFGPGTKVTVL	397
D10.	NIQMTQSPVLSASLGDTVSITCQASHDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYD ASHLEAGVPSRFSGSGFGTDFTLTINRLEPEDFAVYCCQYDSPPWTFGQ GKLTVL	398
D12.	DVLTQSPGTMSTLSPGERATLSRASQSVSRTYLAWHQKPGQAPRLLIY GASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLSISRLEPEDFAVYCCQHDTSQWTFG QGKLTVL	399
C7.	DIVMTQTPLSLVTGQPASISCKSSQSLHSDGKTHLFWYLRPGQSPQ LLIYEVSQRFSRFSGSGFGTDFTLRISRVEADVGVPYCMQGLHIP HTFGQGTKEIK	400
D7.	DIVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSSLVHSDGNIYLNWYHQRPGQSPR RLIYSVSKRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADVGVPYCMQSTHGW TPGQGTKEIK	401
C9.	VIMTQSPSTVSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQKPGKAPNLLIYE ASRLESIGIPSRFSGSGSGTEFTLTIXSLQPDFAVYCCQYDSYSRTFGQ GKVAIK	402
C12.	DVMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSQGIRNYLSWYQKPAKAPKLLIHG ASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQSFMRTPGQ TKVEIK	403
D8.	EIVMTQSPGTLTSLSPGEGATLSRASQSVTSNYLAWYQQRPGASSLQSGQ APRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGFGTDFTLTISRLEPEDFAVYCCQYV NSRTFGQGTKEIK	404
D9.	EIVMTQSPVTLSPVSPGERATLSRASQSVSSKLAWYQKPGQAPRLLIY ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAIYCCQYNDFFTPGPG TKVDIK	405
G7.	EIVLTQTPLSLSPVTLGQPASISCRSSSPVHSDGNIYLSWLHQRPGQPPR LLYKISNRMSGVDPDRFSGSGAGTDFTLRISRVEADVGVPYCMQATQFP SFGQGTKEIK	406
G11.	EIVLTQSPGTLTSLSPGEGATLSRASQSVSSRLAWYQKPGQAPRLLIY GGSIRASGTSTRFSGSGSGTDFTLTINRLEPEDFAVYCCQYGDVFTFG PGTKVDIK	407
F9.	NIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNIGNYLNWYQKPGKAPTGLIYA ASTLHYGVPSRFSRSGSGTDFTVTISSLQPEDSATYCCQSYSTPRTFGQ GTRVELK	408
E9.	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEISNYLNWYQKPGKAPKLLLSA ASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDLATYCCQESYSTLLYTFG QGKLEIK	409
Secuencias de VL a partir de emparejamiento de XB2202 VL		
B1.	SYELTQPPSVSVAPGKTASITCGGNNIGYDSVHWYQKPGQAPVLVVFDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWESGSEHYVFG	410

	TGTQLTVL	
E6.	LPVLTQPPSVSVAPGQTARITSCGNNIGATTVHWYQHRPGQAPVSVIFVD NDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWESTSDHPTFG GGTQLTVL	411
F3.	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGNNIGSKSVHWYQKPGQAPVLVIYYD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSDDHVVFG GGTKLTVL	412
H4.	SYELTQSPSVSVPPGQTARITCGNNIVSKGVHWYQORPGQAPVLVYDD SDRPSGIPERFAGFNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGHRGVF GGGKTVL	413
H5.	SYELTQPPSVSMAPGKTARITCGNNLGSKIVHWYQKPGQAPVVVIYSD RDRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGVEAGDEADYYCQVWDSATDHVVFG GGTKLTVL	414
B5.	SYELTQPPSVSVAPGQTATITCAGNNIGKSVQWYQKPGQAPVVVYDD YGRPSGIPERVSGSNSGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDSRHHVVFG GGTKLTVL	415
G6.	QLVLTQPPSVSVSPGQTASITCGDNLGHTNACWYQONPGQSPVLVIYQD TKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIXRVXAGDEANYCQVWDINDYAVFG TGTXLTVL	416
C1.	QSVLTQSPGTLSPGERATLSCTASQSVSSTYLTWYQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSPPMYT FGQL	417
F1.	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQNIIDYDLAWYQXKPGKAPKLLIYG ASNLEGGVPSRFXSGSGTEFTLTISLQPDXSATYYCQYVITYPLTFGQ GTRLEIK	418
A3.	AIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCQASQVIDKYVNWYRQRPKAPPELLIYG ASTLESQVPSRFXSGSGTGFTFTISVQPEDFATYICQYVDSVPLTFGP GTILDVKRTVA	419
B4.	DIQMTQSPSTLSASIGDRTVITCQASQDIFHYLNWFQKPGKAPKLLIYE ASNLETGVPSRFXSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQYEDLPSFGGG TKVDIKRTVA	420
B6.	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCTASQSVSNYLAHYQKPGQAPRLLIF AASNRATGIPDRFTGSASGTDFTLTINRVEPEDLAVYYCQYGSFPYSFG QGTKEIK	421
F2.	NIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCQASQFIHYLNWYQKLGKAPKLLIYG ASNLERGVPSRFXSGSGTEFTFTIDSLQPEDATYFCQYQNPPTFGG GTKVEINGTVA	422
D3.	AIRMTOQSPSTLSASIGDRISVTCRASQDVGIYVWFQKPGKPPRSLIYA ASYLQTAVPKFRSGSGTDFTLTISDLQPDFAVYYCQYKTFPHTFGQ GKLDKRTVA	423
G2.	VIWMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQDINTWLAHYQKPGKAPKLLMFK VSTLESQDPSRFXSGSGTEFTLTIVSSLPDDSAIYYCQYHSYPYTFGQ GTRLEIK	424
A4.	DVWMTQSPSTLSASVGDRTVITCQASQDISNWLWYQKPGKAPKLLIYE ASNLETGVPSRFXSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQYNNVLRTPGQ GTKVEIK	425
G4.	EIVMTXSPATLSVSPGERVTLSCRVSQNVFSDLAHYQKRTGQSPRLLIHG ASTRATGIPTRFSGSGTEFTLTISLXSDFAVYYCQYNNKWPFTFGQ TKVEIK	426
D5.	AIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQDNIGNYLNWYQKPGKAPTCLIYA ASTLHYGVPSRFXSGSGTEFTFTISLXSDFAVYYCQYNNWPPFTFG QGTTVDIKRTVA	427
A1.	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASQSVSFLAWYQKPGQAPRLLIFE ASTRATGISARFSGSGSGTDFTLTISTLEPEDFAVYYCQYRSGVTFGQ TRLEIK	428
H2.	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRATESISILWLAHYQEPKAPNLLVSQ ASSLKTGVPSRFXSGSGTEFTLTISLHPDDFATYVCQHYHTYPTFGP GTKVDMKRTVA	429
E2.	EIVLTQSPDSXAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAHYQKPGQPP RLLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISRQAEDVAVYYCQYQYLT PTFTVTFGQGTKEIK	430
F4.	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQDISSWLAHYQKPGKAPKFLIYR ATNLQSGVPSRFXSGSGTDFTLTISLQPDFAVYYCQYQNTFTPLTFGG GTKVEVKRTVA	431
C5.	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAHYQKPGQPP KLLFYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYQYHTT	432

	PYTFGQGTKLEIK	
E5.	VIWMTQSPSSLSASVGDVRSITCRASQTFTSHLNWYQQKPGQPPKLLIFA ASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINGLQATDFATYYCQQSFSSPWTFGQ GTTVDVKGTVA	433
F6.	DIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCRASQSVNVYLNWYQQKPGKAPKLLIYS ASTLQSGVPSRFTGSGSRDFTLTINGLQPEDFATYYCQQSFSTLTVTFGP GTRVDVTRTVA	434
G5.	DIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCRASQDISSSLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASTLQSGVPSRFSGRASGTDFTLTIDSLQPEDFATYYCQQFNYSPLSFGG GTKVELKRTVA	435
A5.	SYELTQPPSASASLGASVTLTCTVSSGYRSYEVDFQQRPGKGRPRFVMRV GTGGIVGSRGDGIPDRFSVWGSGLNRYLTIEDIQEEDSDYYCGADHSGS SNLVYVFGTGKVTVL	436
D6.	QLVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSDDYSSYNVDWYQQRPGMGPRFLMRV GTGGIVGSRGDGIPDRFSVWGSGLNRYLTIKNIQEEDSDYYCGADHSGS SDFVYVFGTGKLTVL	437
E4.	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVAVNWYQQLPRTAPKLLIY TNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEANYCAAWDDSLNGPV FGGGTQTLTVL	438
F5.	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVGYWYQFPPTAPKLLIY TDDRPSGVPDRFSGSKSGTTASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLSGPV FGGGTQTLTVL	439
G1.	QTVVTQPPSVSGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVDWYQQFPGSAPKLLIY TTNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDLSNPK WVFGGGTKLTVL	440
E3.	DIVMTQSPFLSLFVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNFLDWYQKPGQSPQ LLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQALQTS WTFGQGTKLEIK	441
A2.	DICRIRPLIRLTIGTITINYNCCDDTVSTLPAHPWTAGLHLQSPRRL MYQVSTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQGTWHPYT FGGQTKLEIRRTVA	442
D1.	DIVMTQTPSLSVTPGQPAASICKSSQSLVHRDGKTYLYWYQKPGHSPQ LLVYEASSRFSGVPDRISGSASGTQFTLNISRVEAEDVGLYYCMQSRNLP KTFGQGTKVEIK	443
C4.	SYELTQPTSLASPGASASLTCTLSGFFNVSYNIWYQQKPGSPQVLL RYRSDSDRHQSGVPSRFSGSKDASANAGILVISALQSDDEADYYCMVWY SANVFGGG	444
E1.	SYELTQPLSVSVALGQTATITCAGNNIGTYYVHWYQQRPQAPVLVMYRD TNRPSGISDRFSGSNGSDTATLTICGVQVGEADYYCHVLDSSITIVIFGG GTQTLTVL	445
A6.	QSVLTQSPATLSVSPGERASLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLIY ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVVYCHQYNNWPLYTPG QGTKLTVL	446
H1.	QSVLTQDPAVPVALGQTVRITCQGDLSRTYYASWYQQKPGQAPLLVIYK NTRPSGIPVRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSGYYLLFG TGTKLTVL	447
B2.	QAVLTQEPFLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGHYPYWYQKPGQAPRTLI YDASNKHSWTPARFSGSLLGKAALTLGAQPEDEAEYCLLSYSGAGV GTGKVTVL	448
C2.	DIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCRASQDITGLGWYQQKPGKAPKLLIFD SSTLQSGVPSRFSGSLSGTDFTLTITNLQPEDFATYYCLQDYSFPYTFGQ GTLQIKRTVA	449
G3.	SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELKYYKTCWYHQKPGQSPVLLIYQD TKRPSGIPERFSGSRSENTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSHAVFGRG TQTLTVL	450
H3.	H3SYVLTQPPSVSVFPGQTARITCSGSTFPKLYSFWYQQKTGQAPLLVIY KDTERRPSGIPERFSGSGTSTVTTLIISGVQPEDDADYYCQSEDSRGPVFG GGTKVTVL	451
D4.	GVVMTQTPSLSLVTLGQPASISCRSSSVVHDDGNTYLSWLQORPGQPPR LLIYKISNRFSGVPSRFSGSGAGTDFTLKISRVEPEDVGVYCVQATHFP VTFGGGTRVEIK	452
C6.	QSALTQPASVSASPGQSVTISCTGTSDDVGRYDYVSWYQQHPGAPKLLI YDVNRRPSGVSDRFSGSKSANKASLTISGLQADDEGDYYCCSYTTGSTLY LFGTGTQTLTVL	453

En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO:1 junto con una o más secuencias de aminoácidos de la región CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-317. En aspectos de ejemplo de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende secuencias de aminoácidos HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2 y 3; 1, 2 y 34; 1, 3 y 35; 1, 4 y 35; 1, 5 y 36; 1, 6 y

36; 1, 3 y 36; 1, 7 y 36; 1, 8 y 36; 1, 9 y 36; 1, 10 y 38; 1, 2 y 38; 1, 11 y 39; 1, 12 y 40; 1, 13 y 41; 1, 13 y 42; 1, 13 y 33; 1, 14 y 43; 1, 14 y 44; 1, 15 y 45; 1, 16 y 45; 1, 17 y 46; 1, 18 y 47; 1, 19 y 47; 1, 20 y 48; 1, 2 y 49; 1, 21 y 50; 1, 2 y 51; 1, 2 y 52; 1, 2 y 53; 1, 22 y 54; 1, 23 y 55; 1, 24 y 56; 1, 25 y 46; 1, 26 y 57; 1, 27 y 58; 1, 28 y 59; 1, 29 y 60; 1, 30 y 61; 1, 31 y 62; y, 1, 32 y 62, respectivamente.

- 5 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, comprende además las secuencias de aminoácidos LCDR3, LCDR2 y LCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 63, 148 y 233; 64, 149 y 234; 65, 150 y 235; 66, 151 y 236; 67, 152 y 237; 68, 153 y 238; 69, 154 y 239; 70, 155 y 240; 71, 156 y 241; 72, 157 y 242; 73, 158 y 243; 741, 159 y 244; 75, 160 y 245; 76, 161 y 246; 77, 162 y 247; 78, 163 y 248; 79, 164 y 249; 80, 165 y 250; 81, 166 y 251; 82, 167 y 252; 83, 168 y 253; 84, 169 y 254; 85, 170 y 255; 86, 171 y 256; 87, 172 y 257; 88, 173 y 258; 89, 174 y 259; 90, 175 y 260; 91, 176 y 261; 92, 177 y 262; 93, 178 y 263; 94, 179 y 264; 95, 180 y 265; 96, 181 y 266; 97, 182 y 267; 98, 183 y 268; 99, 184 y 269; 100, 185 y 270; 101, 186 y 271; 102, 187 y 272; 103, 188 y 273; 104, 189 y 274; 105, 190 y 275; 106, 191 y 276; 107, 192 y 277; 108, 193 y 278; 109, 194 y 279; 110, 195 y 280; 111, 196 y 281; 112, 197 y 282; 113, 198 y 283; 114, 199 y 284; 115, 200 y 285; 116, 201 y 286; 117, 202 y 287; 118, 203 y 288; 119, 204 y 289; 120, 205 y 290; 121, 206 y 291; 122, 207 y 292; 123, 208 y 293; 124, 209 y 294; 125, 210 y 295; 126, 211 y 296; 127, 212 y 297; 128, 213 y 298; 129, 214 y 299; 130, 215 y 300; 131, 216 y 301; 132, 217 y 302; 133, 218 y 303; 134, 219 y 304; 135, 220 y 305; 136, 221 y 306; 137, 222 y 307; 138, 223 y 308; 139, 224 y 309; 140, 225 y 310; 141, 226 y 311; 142, 227 y 312; 143, 228 y 313; 144, 229 y 314; 145, 220 y 315; 146, 231 y 316; y, 147, 232 y 317, respectivamente.

- 20 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1, y las secuencias de aminoácidos seleccionada LCDR3, LCDR2 y LCDR1 s del grupo que consiste en SEQ ID NO: 63, 148 y 233; 64, 149 y 234; 65, 150 y 235; 66, 151 y 236; 67, 152 y 237; 68, 153 y 238; 69, 154 y 239; 70, 155 y 240; 71, 156 y 241; 72, 157 y 242; 73, 158 y 243; 741, 159 y 244; 75, 160 y 245; 76, 161 y 246; 77, 162 y 247; 78, 163 y 248; 79, 164 y 249; 80, 165 y 250; 81, 166 y 251; 82, 167 y 252; 83, 168 y 253; 84, 169 y 254; 85, 170 y 255; 86, 171 y 256; 87, 172 y 257; 88, 173 y 258; 89, 174 y 259; 90, 175 y 260; 91, 176 y 261; 92, 177 y 262; 93, 178 y 263; 94, 179 y 264; 95, 180 y 265; 96, 181 y 266; 97, 182 y 267; 98, 183 y 268; 99, 184 y 269; 100, 185 y 270; 101, 186 y 271; 102, 187 y 272; 103, 188 y 273; 104, 189 y 274; 105, 190 y 275; 106, 191 y 276; 107, 192 y 277; 108, 193 y 278; 109, 194 y 279; 110, 195 y 280; 111, 196 y 281; 112, 197 y 282; 113, 198 y 283; 114, 199 y 284; 115, 200 y 285; 116, 201 y 286; 117, 202 y 287; 118, 203 y 288; 119, 204 y 289; 120, 205 y 290; 121, 206 y 291; 122, 207 y 292; 123, 208 y 293; 124, 209 y 294; 125, 210 y 295; 126, 211 y 296; 127, 212 y 297; 128, 213 y 298; 129, 214 y 299; 130, 215 y 300; 131, 216 y 301; 132, 217 y 302; 133, 218 y 303; 134, 219 y 304; 135, 220 y 305; 136, 221 y 306; 137, 222 y 307; 138, 223 y 308; 139, 224 y 309; 140, 225 y 310; 141, 226 y 311; 142, 227 y 312; 143, 228 y 313; 144, 229 y 314; 145, 220 y 315; 146, 231 y 316; y, 147, 232 y 317, respectivamente.

- 35 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, comprende secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2 y 3; 1, 2 y 34; 1, 3 y 35; 1, 4 y 35; 1, 5 y 36; 1, 6 y 36; 1, 3 y 36; 1, 7 y 36; 1, 8 y 36; 1, 9 y 36; 1, 10 y 38; 1, 2 y 38; 1, 11 y 39; 1, 12 y 40; 1, 13 y 41; 1, 13 y 42; 1, 13 y 33; 1, 14 y 43; 1, 14 y 44; 1, 15 y 45; 1, 16 y 45; 1, 17 y 46; 1, 18 y 47; 1, 19 y 47; 1, 20 y 48; 1, 2 y 49; 1, 21 y 50; 1, 2 y 51; 1, 2 y 52; 1, 2 y 53; 1, 22 y 54; 1, 23 y 55; 1, 24 y 56; 1, 25 y 46; 1, 26 y 57; 1, 27 y 58; 1, 28 y 59; 1, 29 y 60; 1, 30 y 61; 1, 31 y 62; y, 1, 32 y 62, respectivamente, y secuencias de aminoácidos de LCDR3, LCDR2 y LCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 63, 148 y 233; 64, 149 y 234; 65, 150 y 235; 66, 151 y 236; 67, 152 y 237; 68, 153 y 238; 69, 154 y 239; 70, 155 y 240; 71, 156 y 241; 72, 157 y 242; 73, 158 y 243; 741, 159 y 244; 75, 160 y 245; 76, 161 y 246; 77, 162 y 247; 78, 163 y 248; 79, 164 y 249; 80, 165 y 250; 81, 166 y 251; 82, 167 y 252; 83, 168 y 253; 84, 169 y 254; 85, 170 y 255; 86, 171 y 256; 87, 172 y 257; 88, 173 y 258; 89, 174 y 259; 90, 175 y 260; 91, 176 y 261; 92, 177 y 262; 93, 178 y 263; 94, 179 y 264; 95, 180 y 265; 96, 181 y 266; 97, 182 y 267; 98, 183 y 268; 99, 184 y 269; 100, 185 y 270; 101, 186 y 271; 102, 187 y 272; 103, 188 y 273; 104, 189 y 274; 105, 190 y 275; 106, 191 y 276; 107, 192 y 277; 108, 193 y 278; 109, 194 y 279; 110, 195 y 280; 111, 196 y 281; 112, 197 y 282; 113, 198 y 283; 114, 199 y 284; 115, 200 y 285; 116, 201 y 286; 117, 202 y 287; 118, 203 y 288; 119, 204 y 289; 120, 205 y 290; 121, 206 y 291; 122, 207 y 292; 123, 208 y 293; 124, 209 y 294; 125, 210 y 295; 126, 211 y 296; 127, 212 y 297; 128, 213 y 298; 129, 214 y 299; 130, 215 y 300; 131, 216 y 301; 132, 217 y 302; 133, 218 y 303; 134, 219 y 304; 135, 220 y 305; 136, 221 y 306; 137, 222 y 307; 138, 223 y 308; 139, 224 y 309; 140, 225 y 310; 141, 226 y 311; 142, 227 y 312; 143, 228 y 313; 144, 229 y 314; 145, 220 y 315; 146, 231 y 316; y, 147, 232 y 317, respectivamente.

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos de VH expuesta en SEQ ID NO: 318-368.

- 55 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos de VL expuestas en SEQ ID NO: 369-453.

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende la secuencia de aminoácidos de la región VH expuesta en SEQ ID NO: 318, 321 o 360 emparejada con una secuencia de aminoácidos de la región VL seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 369-453.

En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una o más secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID NO: 1-317, en la que la una o más secuencias de aminoácidos de la región CDR comprende al menos una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos). Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase se define por las propiedades de cadena lateral de aminoácidos físicoquímicos comunes y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza, según se determina, por ejemplo, mediante una matriz de intercambio de frecuencia Dayhoff estándar o una matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. De este modo, un residuo de aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-PDGFR β se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

En un aspecto adicional, la presente memoria descriptiva describe anticuerpos anti-PDGFR β , o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región VH y/o VL con aproximadamente 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad con la secuencia de aminoácidos de la región VH expuesta en la SEQ ID NO: 318-368, y/o la secuencia de aminoácidos de la región VL expuesta en SEQ ID NO: 369-453, respectivamente.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva revela anticuerpos anti-PDGFR que se unen al mismo epítipo y/o compiten en cruz con un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VH expuesta en SEQ ID NO: 318. Tales anticuerpos se pueden identificar usando ensayos de unión competitiva de rutina que incluyen, por ejemplo, ensayos de competición en base a resonancia de plasmón superficial (SPR).

En otro adicional, la presente memoria descriptiva describe una biblioteca diversa de dominios VH no emparejados en el que cada miembro de la biblioteca se une específicamente a PDGFR β humano y en el que la diversidad reside en las regiones FR1-FR3. En un aspecto, cada miembro de la biblioteca comprende una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada idéntica (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1) que se une específicamente a PDGFR β humano, y en el que la diversidad reside en las regiones FR1-FR3.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe una biblioteca diversa de pares VH/VL estables en la que cada miembro de la biblioteca se une al PDGFR β humano. Preferiblemente, cada miembro de la biblioteca comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos CDR3 expuesta en SEQ ID NO: 1. Los pares VH/VL estables se pueden seleccionar usando cualquier método conocido en la técnica, incluidos, sin limitación, los expuestos en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 61/453.106.

Se puede emplear cualquier tipo de biblioteca de expresión del dominio VH o VL en los métodos descritos en este documento. Las bibliotecas de expresión apropiadas incluyen, sin limitación, bibliotecas de expresión de ácido nucleico, expresión de fagos y expresión de la superficie celular (por ejemplo, células de levadura, mamíferos y bacterias). En un aspecto, la biblioteca descrita en este documento es una biblioteca de expresión del ácido nucleico generada según los métodos expuestos en el documento WO2010/011944. Los métodos para cribar las bibliotecas de expresión son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Anticuerpo Engineering: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology Volume 248*, (B.K.C. Lo, Ed) Humana Press, 2004 (ISBN: 1-58829-092-1).

III. Polipéptidos de unión modificados

En ciertos aspectos, los polipéptidos de unión de la divulgación pueden comprender una o más modificaciones. Las formas modificadas de polipéptidos de unión descritos en este documento se pueden hacer usando cualquier técnica conocida en la técnica.

i) Reducción de la inmunogenicidad

En ciertos aspectos, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la divulgación se modifican para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden ser quimerizados, humanizados y/o desinmunizados.

En un aspecto, un anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, de la divulgación puede ser quimérico. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos de producción de anticuerpos quiméricos, o fragmentos de los mismos, son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985);

Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397. Techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) se pueden emplear para la síntesis de dichas moléculas. Por ejemplo, una secuencia genética que codifica una especificidad de unión de una molécula de anticuerpo anti-PDGFR β de ratón se puede fusionar junto con una secuencia de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se usa en este documento, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

En otro adicional, un anticuerpo, o una parte de unión al antígeno del mismo, de la divulgación se humaniza. Los anticuerpos humanizados tienen una especificidad de unión que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano y regiones marco de una molécula de anticuerpo humano. A menudo, los residuos marco en las regiones marco humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véanse, por ejemplo, Queen et al., la Patente de los Estados Unidos No. 5,585,089; Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239,400; PCT publication WO 91/09967; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), veneering o resurfacing (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994)), y barajado de cadenas (la Patente de los Estados Unidos No. 5,565,332).

En algunos aspectos, la desinmunización se puede usar para disminuir la inmunogenicidad de los polipéptidos de unión a PDGFR β (por ejemplo, anticuerpo o parte de unión al antígeno de los mismos). Como se usa en este documento, el término "desinmunización" incluye la alteración del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo) para modificar los epítomos de células T (véanse, por ejemplo, los documentos WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, se pueden analizar las secuencias VH y VL del anticuerpo PDGFR β inicial específico, o la parte de unión al antígeno del mismo, de la especificación y se puede generar un "mapa" de epítomos de células T humanas a partir de cada región V que muestra la ubicación de los epítomos en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítomos individuales de células T del mapa de epítomos de células T se analizan para identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña un intervalo de secuencias alternativas de VH y VL que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en un intervalo de anticuerpos específicos de PDGFR β o fragmentos de los mismos para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento, que luego se prueban para función. Por lo general, se generan y prueban entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones V modificada y C humana se clonan luego en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Los anticuerpos luego se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

ii) Funciones efectoras y modificaciones Fc

Los polipéptidos de unión de la especificación pueden comprender una región constante de anticuerpo (por ejemplo, una región constante de IgG, por ejemplo, una región constante de IgG humana, por ejemplo, una región constante de IgG1 o IgG4 humana) que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Adicionalmente, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la absorción y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunes, la lisis de las células diana recubiertas de anticuerpos por células asesinas (llamadas citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas. En algunos aspectos, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la especificación se unen a un receptor Fc-gamma. En aspectos alternativos, los polipéptidos de unión de la especificación pueden comprender una región constante que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad ADCC) y/o no se puede unir al receptor Fc γ .

Ciertos aspectos de la especificación incluyen anticuerpos anti-PDGFR β en los que se ha eliminado o de otra manera se ha alterado al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante para proporcionar las características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas o mejoradas, la capacidad de dimerizarse de forma no covalente, mayor capacidad de localización en el sitio de un tumor, semivida sérica reducida o semivida sérica aumentada en comparación con un anticuerpo completo sin alteraciones de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento son anticuerpos con dominio eliminado que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una parte de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio CH2.

En ciertos otros aspectos, los polipéptidos de unión comprenden regiones constantes derivadas de diferentes isotipos de anticuerpos (por ejemplo, regiones constantes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana). En otros aspectos, los polipéptidos de unión comprenden una bisagra quimérica (esto es, una bisagra que comprende partes de bisagra derivadas de dominios de bisagra de diferentes isotipos de anticuerpos, por ejemplo, un dominio de bisagra superior de una molécula IgG4 y un dominio de bisagra media IgG1). En un aspecto, los polipéptidos de unión comprenden una región Fc o una parte de la misma de una molécula de IgG4 humana y una mutación Ser228Pro (numeración de la EU) en la región central de la bisagra de la molécula.

En ciertos aspectos, la parte Fc puede mutarse para aumentar o disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones constantes de la región sean consistentes con la unión del complemento moderada de la presente divulgación y, por lo tanto, reducen la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden usar otras modificaciones de la región constante para modificar enlaces disulfuro o unidades estructurales de oligosacáridos que permiten una localización mejorada debido a una especificidad o flexibilidad de antígeno aumentada. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, la biodistribución y la semivida en suero, se pueden medir y cuantificar fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin excesiva experimentación.

En ciertos aspectos, un dominio Fc empleado en un anticuerpo de la divulgación es una variante Fc. Como se usa en este documento, el término "variante Fc" se refiere a un dominio Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con respecto al dominio Fc de tipo salvaje del que se deriva dicho dominio Fc. Por ejemplo, en el que el dominio Fc se deriva de un anticuerpo IgG1 humano, la variante Fc de dicho dominio Fc IgG1 humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a dicho dominio Fc.

La(s) sustitución(es) de aminoácidos de una variante de Fc se pueden ubicar en cualquier posición (esto es, cualquier posición de aminoácidos de la convención de la EU) dentro del dominio de Fc. En un aspecto, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio de bisagra o parte del mismo. En otro aspecto, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH2 o una parte del mismo. En otro aspecto, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH3 o parte del mismo. En otro aspecto, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH4 o una parte del mismo.

Los polipéptidos de unión de la especificación pueden emplear cualquier variante de Fc reconocida en la técnica que se sabe que imparte una mejora (por ejemplo, reducción o mejora) en la función efectora y/o la unión de FcR. Dichas variantes de Fc pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas en las publicaciones internacionales PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/105787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2 o las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; y 7,083,784. En un aspecto de ejemplo, un polipéptido de unión de la divulgación puede comprender una variante Fc que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 268 de la EU (por ejemplo, H268D o H268E). En otro aspecto de ejemplo, un polipéptido de unión de la especificación puede comprender una sustitución de aminoácidos en la posición 239 de la EU (por ejemplo, S239D o S239E) y/o la posición 332 de la EU (por ejemplo, I332D o I332Q).

En ciertos aspectos, un polipéptido de unión de la especificación puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera las funciones efectoras independientes del antígeno del anticuerpo, en particular la semivida circulante del polipéptido de unión. Tales polipéptidos de unión exhiben una unión ya sea aumentada o disminuida a FcRn en comparación con los polipéptidos de unión que carecen de estas sustituciones, por lo tanto, tienen una semivida aumentada o disminuida en el suero, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tienen semividas en suero más largas, y tales moléculas

tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea una semivida prolongada del anticuerpo administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónico. En contraste, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida tengan semividas más cortas, y tales moléculas también son útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero donde un tiempo de circulación reducido puede ser ventajoso, por ejemplo, para diagnóstico por imagen *in vivo* o en situaciones en las que el anticuerpo inicial tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante periodos prolongados. Las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida también tienen menos probabilidades de cruzar la placenta y, de este modo, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Adicionalmente, otras aplicaciones en las que se puede desear una afinidad de unión a FcRn reducida incluyen aquellas aplicaciones en las que se desea la localización del cerebro, riñón y/o hígado. En un aspecto de ejemplo, los polipéptidos de unión alterados (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la especificación exhiben transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales desde la vasculatura. En otro aspecto, los polipéptidos de unión alterados (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la especificación exhiben transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) desde el cerebro, hacia el espacio vascular. En un aspecto, un anticuerpo con unión a FcRn alterada comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio Fc. El bucle de unión a FcRn está compuesto por residuos de aminoácidos 280-299 (según la numeración de la EU). Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo que alteraron la actividad de unión a FcRn se describen en la publicación internacional PCT No. WO05/047327. En ciertos aspectos de ejemplo, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la especificación comprenden un dominio Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E y S304D (numeración de la EU).

En otro aspecto, los polipéptidos de unión, para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4, que se altera para reducir o eliminar la glicosilación. Por ejemplo, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la especificación también pueden comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera la glicosilación del anticuerpo Fc. Por ejemplo, dicha variante de Fc puede tener una glicosilación reducida (por ejemplo, glicosilación ligada a N u O). En aspectos de ejemplo, la variante Fc comprende una glicosilación reducida del glucano ligado a N que normalmente se encuentra en la posición de aminoácido 297 (numeración de la EU). En otro aspecto, el anticuerpo tiene una sustitución de aminoácidos cerca o dentro de un motivo de glicosilación, por ejemplo, un motivo de glicosilación unido a N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS. En un aspecto particular, el anticuerpo comprende una variante Fc con una sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido 228 o 299 (numeración de la EU). En aspectos más particulares, el anticuerpo comprende una región constante IgG1 o IgG4 que comprende un S228P y una mutación T299A (numeración de la EU).

Las sustituciones de ejemplo de aminoácidos que confieren glicosilación reducida o alterada se describen en la Publicación Internacional PCT No. WO05/018572. En algunos aspectos, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la especificación se modifican para eliminar la glicosilación. Tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden denominarse anticuerpos "agly", o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos "agly"). Aunque no está limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos "agly", o fragmentos de los mismos, pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado *in vivo*. Los anticuerpos agly de ejemplo, o fragmentos de los mismos, comprenden una región Fc aglicosilada de un anticuerpo IgG4 que carece de la función efectora de Fc, eliminando así el potencial de toxicidad mediada por Fc para los órganos vitales normales que expresan PDGFRβ. En aún otros aspectos, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la especificación comprenden un glicano alterado. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un número reducido de residuos de fucosa en un N-glucano en Asn297 de la región Fc, esto es, está afucosilado. En otro aspecto, el anticuerpo puede tener un número alterado de residuos de ácido siálico en el N-glucano en Asn297 de la región Fc.

iii) Unión covalente

Los polipéptidos de unión de la invención se pueden modificar, por ejemplo, mediante la unión covalente de una molécula al polipéptido de unión de modo que la unión covalente no impida que el polipéptido de unión se una específicamente a su epítipo afín. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la invención se pueden modificar por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

El polipéptido de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se puede fusionar adicionalmente de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PDGFRβ se pueden fusionar de forma recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos,

radionúclidos o toxinas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la Patente de los Estados Unidos No. 5,314,995; y EP 396,387.

Los polipéptidos de unión se pueden fusionar con polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, el PEG se puede conjugar con los polipéptidos de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong, S. R., et al., Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

Adicionalmente, los polipéptidos de unión de la invención se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales son comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de la hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)) y la etiqueta "flag".

Los polipéptidos de unión de la invención se pueden usar en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de dianas, o para la obtención de imágenes o terapia del paciente. Los polipéptidos de unión de la invención se pueden marcar o conjugar ya sea antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los polipéptidos de unión de la invención se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

La presente invención abarca además polipéptidos de unión de la invención conjugados a un agente de diagnóstico o terapéutico. Los polipéptidos de unión se pueden usar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de un trastorno de las células inmunes (por ejemplo, CLL) como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un tratamiento y/o régimen de prevención dado. La detección se puede facilitar acoplando los polipéptidos de unión a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,741,900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnóstico como se describe en este documento. Los ejemplos de enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos protésicos apropiados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo apropiado incluyen 125I, 131I, 111In o 99Tc.

Los polipéptidos de unión para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento se pueden conjugar con citotoxinas (tales como radioisótopos, fármacos citotóxicos o toxinas) agentes terapéuticos, agentes citostáticos, toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, linfocinas u otros anticuerpos en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora tal como una célula T) o PEG.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-PDGRF β para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento se puede conjugar con una molécula que disminuye el crecimiento de células tumorales. En otras realizaciones, las composiciones descritas pueden comprender el polipéptido de unión acoplado a fármacos o profármacos. Todavía otras realizaciones de la presente invención comprenden el uso de polipéptidos de unión conjugados con biotoxinas específicas o sus fragmentos citotóxicos tales como ricina, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria. La selección de qué anticuerpo conjugado o no conjugado se usa dependerá del tipo y estadio del cáncer, el uso del tratamiento complementario (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y la condición del paciente. Se apreciará que un experto en el arte podría hacer fácilmente dicha selección en vista de las enseñanzas en este documento.

Se apreciará que, en estudios previos, los anticuerpos antitumorales marcados con isótopos se han usado con éxito para destruir células tumorales en modelos animales, y en algunos casos en humanos. Los radioisótopos de ejemplo incluyen: 90Y, 125I, 131I, 123I, 111In, 105Rh, 153Sm, 67Cu, 67Ga, 166Ho, 177Lu, 186Re y 188Re. Los radionúclidos actúan produciendo radiación ionizante que provoca la ruptura de múltiples cadenas en el ADN nuclear, lo que conduce a la muerte celular. Los isótopos usados para producir conjugados terapéuticos por lo general producen partículas alfa o beta de alta energía que tienen una longitud de trayectoria corta. Tales radionúclidos matan las células a las que están muy cerca, por ejemplo, las células neoplásicas a las que se ha

unido o ha entrado el conjugado. Tienen poco o ningún efecto sobre las células no localizadas. Los radionucleidos son esencialmente no inmunogénicos.

IV. Expresión de polipéptidos de unión

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar los polipéptidos de unión de la invención como se expone anteriormente, los genes se insertan por lo general en un vector de expresión para su introducción en las células huésped que se pueden usar para producir la cantidad deseada de los polipéptidos de unión reivindicados.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en este documento para los fines de la especificación y las reivindicaciones, para referirse a los vectores usados de acuerdo con la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula. Como saben los expertos en el arte, tales vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines de esta invención. Por ejemplo, una clase de vector usa elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus del polio, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión a ribosomas. Adicionalmente, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador seleccionable se puede unir directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducir en la misma célula por cotransformación. También se pueden necesitar elementos adicionales para una síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señal, señales de empalme, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. En realizaciones particularmente preferidas, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (preferiblemente humanos) sintéticos como se discutió anteriormente.

En otras realizaciones preferidas, los polipéptidos de unión de la invención se pueden expresar usando construcciones policistrónicas. En tales sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de una sola construcción policistrónica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos de la invención en células huésped eucariotas. Secuencias IRES compatibles se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6,193,980. Los expertos en el arte apreciarán que tales sistemas de expresión se pueden usar para producir eficazmente la gama completa de polipéptidos descritos en la solicitud instantánea.

Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un polipéptido de unión, el vector de expresión se puede introducir en una célula huésped apropiada. Es decir, las células huésped se pueden transformar. La introducción del plásmido en la célula huésped se puede lograr mediante diversas técnicas bien conocidas para los expertos en el arte. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN encapsulado, microinyección e infección con virus intacto. Véase, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Más preferiblemente, la introducción del plásmido en el huésped es por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se analizan para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo de ejemplo incluyen ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se usa en este documento, el término "transformación" se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula huésped receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, da como resultado un cambio en la célula receptora.

En esa misma línea, "células huésped" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procedimientos para el aislamiento de polipéptidos de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar ya sea de células enteras hiladas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

En una realización, la línea celular huésped usada para unir la expresión de polipéptidos es de origen mamífero; los expertos en el arte pueden determinar líneas celulares huésped particulares que son más apropiadas para el producto génico deseado que se expresará en ellas. Las líneas celulares huésped de ejemplo incluyen, pero no se

limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), R1610 (fibroblastos de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/0 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona una glicosilación alterada, por ejemplo, afucosilación, del anticuerpo expresado a partir de la misma (por ejemplo, líneas celulares CHO inactivadas con FUT8 o PER.C6® (Crucell) (células Potelligent.RTM) (Biowa, Princeton, NJ)). En una realización, se pueden usar células NS0. Las células CHO se prefieren particularmente. Las líneas celulares huésped están por lo general disponibles en los servicios comerciales, the American Tissue Culture Collection o en la literatura publicada.

La producción *in vitro* permite la ampliación para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en la técnica e incluyen un cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor de agitación por aire o en un reactor de agitación continua, o en cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno) afinidad.

Los genes que codifican los polipéptidos de unión de la invención también se pueden expresar en células no mamíferas tales como bacterias o células de levadura o plantas. A este respecto, se apreciará que también se pueden transformar diversos microorganismos unicelulares no mamíferos tales como bacterias; esto es, aquellos que se pueden cultivar en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como las cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresa en bacterias, los polipéptidos pueden formar parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se deben aislar, purificar y luego ensamblar en moléculas funcionales.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es la más usada entre los microorganismos eucariotas, aunque están disponibles una cantidad de otras cepas. Para la expresión en *Saccharomyces*, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)) se usa comúnmente. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no tiene la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

V. Formulaciones farmacéuticas y métodos de administración de polipéptidos de unión.

En otro aspecto, la especificación describe composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido de unión de la invención y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Los métodos de preparación y administración de los polipéptidos de unión de la invención a un sujeto son bien conocidos o los determinan fácilmente por los expertos en el arte. La ruta de administración de los polipéptidos de unión de la invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral como se usa en este documento incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Generalmente se prefieren las formas intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular de administración parenteral. Si bien todas estas formas de administración se contemplan claramente dentro del alcance de la invención, una forma de administración sería una solución inyectable, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Normalmente, una composición farmacéutica apropiada para inyección puede comprender una solución reguladora (por ejemplo, solución reguladora de acetato, fosfato o citrato), un surfactante (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas en este documento, los polipéptidos se pueden administrar directamente al sitio de la población celular adversa aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios regulados. En la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, 0.01-0.1 M y preferiblemente solución reguladora de fosfato 0.05 M o solución salina al 0.8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer de lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos, tales como los que se basan en la dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación

extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferiblemente se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido de unión solo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en este documento, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se llenan en contenedores tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas según los métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, las preparaciones se pueden empaquetar y vender en forma de un kit tal como los que se describen en los documentos en trámite U.S. Ser. No. 09/259,337 y U.S. Ser. No. 09/259,338. Tales artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o insertos de paquete que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Las dosis eficaces de los polipéptidos de unión estabilizados de la presente invención para el tratamiento de las condiciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluidos los mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento se pueden ajustar usando métodos de rutina conocidos para los expertos en el arte para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un polipéptido de unión de la invención, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0.01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. Las dosis intermedias en los intervalos anteriores también pretenden estar dentro del alcance de la invención.

A los sujetos se les puede administrar tales dosis diariamente, en días alternativos, semanalmente o según cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo implica la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento de ejemplo adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg por semana. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado puede caer dentro de los intervalos indicados.

El polipéptido de unión de la invención se puede administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de polipéptido o molécula objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una cierta concentración de anticuerpos o toxinas en plasma, por ejemplo, 1-1000 ug/ml o 25-300 ug/ml. Alternativamente, el polipéptido de unión de la invención se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían según la semivida del polipéptido de unión en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. En una realización, el polipéptido de unión de la invención se puede administrar en forma no conjugada. En otra realización, el polipéptido de unión de la invención puede administrarse múltiples veces en forma conjugada. En otra realización más, el polipéptido de unión de la invención se puede administrar en forma no conjugada, luego en forma conjugada, o viceversa.

- La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el presente polipéptido de unión o un cóctel del mismo se administran a un paciente que aún no está en estado de enfermedad para mejorar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis eficaz profiláctica". En este uso, las cantidades precisas nuevamente dependen del estado de salud y la inmunidad general del paciente, pero generalmente varían desde 0.1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0.5 a 2.5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas.
- En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta (por ejemplo, desde aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, con dosis desde 5 a 25 mg que se usan más comúnmente para radioinmunoconjugados y dosis más altas para moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) a veces se requieren intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, la patente se puede administrar en un régimen profiláctico.
- En una realización, un sujeto se puede tratar con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (por ejemplo, en un vector). Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían desde aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 ug a 10 mg o 30-300 ug de ADN por paciente. Las dosis para los vectores virales infecciosos varían desde 10 a 100, o más, viriones por dosis.
- Los agentes terapéuticos se pueden administrar por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Se prefieren la inyección intramuscular o la infusión intravenosa para la administración de un polipéptido de unión de la invención. En algunos métodos, los polipéptidos de unión terapéuticos se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los polipéptidos de unión se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™.
- Los agentes de la invención se pueden administrar opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales preferidos son aquellos que son reconocidos en la técnica y se administran de manera estándar para un trastorno particular.
- Las dosis de tratamiento único eficaces (esto es, cantidades terapéuticamente eficaces) de polipéptidos de unión marcados con 90Y de la invención varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativas eficaces de tratamiento único sin médula de anticuerpos marcados con 131I varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativas eficaces de un solo tratamiento (esto es, pueden requerir un trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con 131I varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo quimérico modificado, debido a la semivida en circulación más prolongada frente a los anticuerpos murinos, un tratamiento único eficaz dosis ablativas sin médula de anticuerpos quiméricos marcados con yodo-131 varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de imagen para, por ejemplo, la etiqueta 111In, son por lo general menores de aproximadamente 5 mCi.
- Si bien se ha adquirido una gran experiencia clínica con 131I y 90Y, otros radiomarcadores son conocidos en la técnica y se han usado para fines similares. Todavía se usan otros radioisótopos para obtener imágenes. Por ejemplo, los radioisótopos adicionales que son compatibles con el alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 123I, 125I, 32P, 57Co, 64Cu, 67Cu, 77Br, 81Rb, 81Kr, 87Sr, 113In, 127Cs, 129Cs, 132I, 197Hg, 203Pb, 206Bi, 177Lu, 186Re, 212Pb, 212Bi, 47Sc, 105Rh, 109Pd, 153Sm, 188Re, 199Au, 225Ac, 211A, y 213Bi. A este respecto, los emisores alfa, gamma y beta son compatibles con la presente invención. Adicionalmente, en vista de la divulgación instantánea, se afirma que un experto en el arte podría determinar fácilmente qué radionucleidos son compatibles con un curso de tratamiento seleccionado sin experimentación excesiva. Para este fin, los radionucleidos adicionales que ya se han usado en el diagnóstico clínico incluyen 125I, 123I, 99Tc, 43K, 52Fe, 67Ga, 68Ga, así como 11In. Los anticuerpos también se han marcado con una variedad de radionúclidos para uso potencial en inmunoterapia dirigida (Peirersz et al. Immunol. Cell Biol. 65: 111-125 (1987)). Estos radionucleidos incluyen 188Re y 186Re así como 199Au y 67Cu en menor medida. la Patente de los Estados Unidos No. 5,460,785 proporciona datos adicionales con respecto a tales radioisótopos.
- Como se discutió previamente, el polipéptido de unión de la invención se puede administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos de mamíferos. A este respecto, se apreciará que el polipéptido de unión descrito se formulará para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden un portador estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica, soluciones reguladoras no tóxicas, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido de unión de la invención, conjugado o no conjugado a un agente terapéutico, se considerará que

significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a un objetivo y lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una diana. En el caso de las células tumorales, el polipéptido será preferiblemente capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido.

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, el polipéptido de unión de la invención se puede administrar a un humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos de la invención se pueden administrar a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el polipéptido de unión de la invención con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Un experto en el arte reconocerá que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de ingrediente activo con el que se combinará, la ruta de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en el arte apreciarán además que un cóctel que comprende una o más especies de polipéptidos según la presente invención puede resultar particularmente eficaz.

VI. Métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a PDGFR β

Los polipéptidos de unión de la invención son útiles para antagonizar la actividad de PDGFR β . De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto, la especificación describe métodos para tratar enfermedades o trastornos asociados a PDGFR β administrando a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos anti-PDGFR β , o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación.

Las enfermedades o trastornos asociados a PDGFR β susceptibles de tratamiento incluyen, sin limitación: Degeneración macular relacionada con la edad (AMD); reestenosis, incluyendo reestenosis coronaria después de angioplastia, aterectomía u otros métodos invasivos de eliminación de placa, y reestenosis de arterias renales o periféricas después de los mismos procedimientos; fenómenos proliferativos vasculares y fibrosis asociados con otras formas de lesión aguda, tales como: fibrosis pulmonar asociada con el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, fibrosis renal asociada con nefritis, estenosis coronaria asociada con la enfermedad de Kawasaki y estrechamientos vasculares asociados con otras arteritis tales como la enfermedad de Takayasha; procedimientos fibróticos, tales como esclerodermia, miofibrosis; y cáncer (por ejemplo, proliferación de células tumorales y neovascularización)

Un experto en el arte podría, mediante experimentación de rutina, determinar qué cantidad eficaz y no tóxica de anticuerpo (o agente terapéutico adicional) sería con el propósito de tratar una enfermedad o trastorno asociado a PDGFR β . Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar según factores tales como el estadio de la enfermedad (por ejemplo, estadio I versus estadio IV), edad, sexo, complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades de inmunodeficiencia) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Generalmente, sin embargo, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0.05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día y más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

VII. Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

Ejemplo 1. Aislamiento de dominios VH que se unen específicamente a PDGFR β humano

Los dominios VH que se unen específicamente al PDGFR β humano se seleccionaron usando la expresión de ADN como se expone en el documento WO2010/011944. Específicamente, una biblioteca de expresión de ADN de dominio VH humano, naïve derivada de diez donantes de médula ósea se sometió a seis rondas de selección contra PDGFR β humano. Los aglutinantes seleccionados fueron clonados y secuenciados. Desde esta criba, se seleccionaron los clones del dominio VH A4, B4 y G2, cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en la tabla 3.

Ejemplo 2. Barajado de HCDR3

A. Construcción de la biblioteca de VH

Para cribar dominios VH con características de unión mejoradas, la secuencia HCDR3 del clon A4 (designado XB 1511) se barajó en una biblioteca VH humana naïve, que se seleccionó adicionalmente para la unión a PDGFR β humano y de ratón. Específicamente, la secuencia de ADN que codifica para la HCDR3 del clon A4 (SEQ ID NO: 1) se sintetizó y ensambló en una biblioteca que comprende regiones marco 1-3 de dominios VH humanos naïve amplificados a partir de células B de médula ósea y PBMC usando oligonucleótidos específicos de marco. Las

regiones marco 1-3 humanas de VH se amplificaron usando cebadores inversos FR3 genéricos 3' y específicos de la familia VH 5' para crear bibliotecas separadas de las regiones marco de la familia VH. Las bibliotecas marco de la familia VH y la XB1511 HCDR3 se barajaron mediante amplificación por PCR adicional usando oligos 5' T7TMV y 3' XB1511 FR3CDR3FR4. Esto también agregó una secuencia promotora T7TMV en el extremo 5' para la transcripción/traducción *in vitro*. También se agregó una secuencia Cμ3 C-terminal y una etiqueta FLAG (para la purificación después de la traducción) mediante PCR usando los cebadores FR4 Cu3 Reverso e Y109, respectivamente, junto con el cebador 5' T7TMV. Las secuencias de ácido nucleico de los oligonucleótidos usados para la preparación de la biblioteca de VH barajado de HCDR3 se exponen en la tabla 5. En la figura 1 se muestra una representación esquemática de la construcción de la biblioteca de VH.

Tabla 5. Oligonucleótidos de construcción de bibliotecas de VH barajado de HCDR3

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO.
FR3 Inverso	CGCACAGTAATACACGGC	454
VH1a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGCAGTCTG	455
VH1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG	456
VH1c	CAATTACTATTTACAATTACAATGSAGGTCCAGCTGGTACAGTCTG	457
VH1d	CAATTACTATTTACAATTACAATGCARATGCAGCTGGTGCAGTCTG	458
VH2	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRTCACCTTGAAGGAGTCTG	459
VH3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	460
VH3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	461
VH3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG	462
VH4a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSTGCAGCTGCAGGAG	463
VH4b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG	464
VH5	CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGCAGTCTG	465
VH6	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG	466
VH7	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTG	467
T7TMVUTR	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA	468
XB1511 FR3CDR3FR4 Inverso	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTAGCTCCTGTCTG CCCCCATGKTGCGCACAGTAATACACGGC	469
FR4 Cu3 Inverso	GGAGACGAGGGGGAAAAGGGTTGAGGAGACGGTGACCAG	470
Y109	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTAAGGACGACTTG TCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGACGAGGGGGAAAAGGGT	471

B. Cribado de la biblioteca

La biblioteca de dominio VH barajado de HCDR3 se transcribió luego en una biblioteca de ARNm y se sometió a selección con tecnología de expresión de ADNbc como se expone en el documento WO2010/011944. La selección se realizó con PDGFRβ humano y de ratón en una ronda alternativa durante 4 rondas. Se aplicó la selección cinética controlada de tasa de asociación y disociación en rondas sucesivas para aumentar la rigurosidad de la selección y, de este modo, seleccionar dominios VH con alta afinidad por PDGFRβ. Específicamente, la selección se realizó de la siguiente manera: Ronda 1 (R1) con 10 nM de PDGFRβ humano inmovilizado; R2 con PDGFRβ de ratón 100 nM inmovilizado; R3 con PDGFRβ humano soluble 10 nM y compitió con PDGFRβ humano inmovilizado 200 nM durante 24 horas y 120 horas; y R4 con 10 nM de PDGFRβ de ratón. El grupo de unión de R4 se subclonó para secuenciación de ADN. El análisis de las secuencias del grupo de unión de R4 mostró que la HCDR3 de XB1511 estaba presente en una variedad de contextos marco diferentes. No se obtuvo una secuencia *original* de tipo salvaje del conjunto de secuencias analizadas. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH seleccionados se exponen en la tabla 3, en este documento.

C. Especificidad de unión de dominios VH barajados HCDR3 seleccionados

El grupo de unión a R4 seleccionado anteriormente se evaluó para la unión a PDGFRβ tanto humano como de ratón usando una biblioteca traducida *in vitro* marcada con ³⁵S Met. Específicamente, se evaluó la unión del conjunto a perlas epoxídicas, 100 nM de IgG humana, PDGFRβ humano y PDGFRβ de ratón. Como se muestra en la figura 2, el dominio VH XB1511 *original* mostró una unión específica a PDGFRβ humano, y una unión indetectable a PDGFRβ de ratón. La biblioteca preseleccionada barajada de marco mostró una unión débil al PDGFRβ humano. Sin embargo, en contraste, la biblioteca barajada de marco R4 mostró una unión significativa a PDGFRβ tanto humano como de ratón.

Ejemplo 3. Identificación de pares VL/VH estables

A. Construcción de bibliotecas de ADN de VL

5 Las bibliotecas de VL humanas (Vkappa y Vlambda) se construyeron a partir de células B de donantes jóvenes sanos (Allcells) mediante RT-PCR. Para garantizar la diversidad de la biblioteca, se obtuvieron 300 millones de células mononucleares de médula ósea y 100 millones de células mononucleares de sangre periférica de diez donantes y se usaron para la construcción de bibliotecas VH y VL naïve. Un esquema del método de generación de la biblioteca se expone en la figura 3.

10 Los cebadores de oligonucleótidos para la síntesis de ADNc y la posterior amplificación por PCR de las secuencias Vkappa y Vlambda se diseñaron como se expone en la tabla 4. Específicamente, se diseñaron cebadores de sentido múltiple de las regiones FR1 de V κ y V λ de cada familia con una secuencia UTR aguas arriba. Los cebadores antisentido para la amplificación de genes κ y λ se diseñaron a partir de las regiones constantes anidadas en C κ 1 (C κ 2) o J λ con el mismo C κ 2 aguas abajo (J λ C κ 2). Las bibliotecas V κ y V λ llevan la misma secuencia C-terminal para la amplificación por PCR durante los ciclos de selección.

15 El ARNm se preparó a partir de donantes individuales usando un kit de preparación de ARNm FastTrack (Invitrogen) siguiendo el protocolo proporcionado por el kit. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir del ARNm aislado usando cebadores específicos para las regiones constantes de cadena ligera kappa y lambda (C κ 1 y C λ 1).

La amplificación por PCR de las secuencias Vkappa y Vlambda se realizó con cebadores específicos de la familia C κ 2 y V κ o mezcla J λ C κ 2 y cebadores específicos de la familia V λ 2 usando ADNc como plantilla. La PCR se realizó para familias individuales V κ e Y λ y, donantes individuales durante 18-20 ciclos. Después de la purificación en gel, las bibliotecas V κ y V λ de cada fuente diferente se agruparon para generar las bibliotecas V κ y V λ finales.

Tabla 6. Oligonucleótidos de construcción de bibliotecas de expresión de ADN de V λ y V κ humano

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO.
Ck1	CAACTGCTCATCAGATGGCGG	472
Cl1	CAGTGTGGCCTTGTGGCTTG	473
Ck2	AGATGGTGCAGCCACAGTTCG	474
Jl1-3Ck2	AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGACGGTSASCTTGGTCCC	475
Jl7Ck2	AGATGGTGCAGCCACAGTTCGGAGACGGTCAGCTGGGTGCC	476
T7TMVUTR	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA	477
Oligos λ		
UTRVk1a	CAATTACTATTTACAATTACAATGRACATCCAGATGACCCAG	478
UTRVk1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGMCATCCAGTTGACCCAG	479
UTRVk1c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGCCATCCRGATGACCCAG	480
UTRVk1d	CAATTACTATTTACAATTACAATGGTCATCTGGATGACCCAG	481
UTRVk2a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGATATTGTGATGACCCAG	482
UTRVk2b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGATRTTGTGATGACTCAG	483
UTRVk3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATTGTGTTGACRCAG	484
UTRVk3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATAGTGATGACGCAG	485
UTRVk3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATTGTAATGACACAG	486
UTRVk4a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGACATCGTGATGACCCAG	487
UTRVk5a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAACGACACTCACGCAG	488
UTRVk6a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATTGTGCTGACTCAG	489
UTRVk6b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGATGTTGTGATGACACAG	490
Oligos λ		
UTRVL1a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGTCTGTGCTGACKCAG	491
UTRVL1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGTCTGTGYTGACGCAG	492
UTRVL2	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGTCTGCCCTGACTCAG	493
UTRVL3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTATGNGCTGACTCAG	494
UTRVL3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTATGAGCTGACACAG	495
UTRVL3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTCTGAGCTGACTCAG	496
UTRVL3d	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTATGAGCTGATGCAG	497
UTRVL4	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGCYTGTGCTGACTCAA	498
UTRVL5	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSCTGTGCTGACTCAG	499
UTRVL6	CAATTACTATTTACAATTACAATGAATTTTATGCTGACTCAG	500
UTRVL7	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRCTGTGGTGACTCAG	501
UTRVL8	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGACTGTGGTGACCCAG	502
UTRVL4/9	CAATTACTATTTACAATTACAATGCWGCCTGTGCTGACTCAG	503
UTRVL10	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGCAGGGCTGACTCAG	504

	R = A/G, Y = C/T, K = G/T, M = A/C, S = G/C, W = A/T	
--	---	--

B. Generación de bibliotecas de fusión VL por expresión de ADNbc

Las bibliotecas de ADN V κ y V λ generadas usando los métodos expuestos en este ejemplo se transcribieron en bibliotecas de ARNm usando el kit T7 Megascript (Invitrogen, Cat # AM 1334). El ARNm se purificó con el kit de limpieza RNeasy MinElute (Qiagen, Cat # 74204) siguiendo el protocolo proporcionado por el kit. Se ligó un total de 600 pmol de ARN (300 pmol de bibliotecas V κ y V λ) y se ensambló con enzimas y componentes de expresión de ADNbc como se describe en el documento WO2010/011944. La biblioteca VL ensamblada se sometió a traducción *in vitro* para crear una biblioteca de fusión en la que cada dominio VL (fenotipo) se fusiona de manera estable con su secuencia de codificación (genotipo). ³⁵S Met se incorporó en el procedimiento de traducción para radiomarcarse las fusiones. Luego, la biblioteca se purificó con oligo dT celulosa, se convirtió en una biblioteca de expresión de ADNbc usando las técnicas estándar de biología molecular de transcripción inversa, digestión con RNasaH, síntesis de ADN bicatenario, seguido de purificación de etiqueta flag.

C. Identificación de pares VL para dominios VH XB1511 y XB2202

El dominio VH XB1511 se tradujo como proteína libre (con incorporación de ³⁵S Met en la reacción de traducción) y se purificó por afinidad a través de una etiqueta flag c-terminal. El dominio VH XB1511 y una biblioteca de fusión de dominio VL purificada (preparada como anteriormente) se mezclaron en una proporción molar igual y se incubaron a 25 °C, durante la noche para permitir la asociación *in vitro* de dominios de fusión VH y VL a través de su parche hidrófobo. La mezcla se puso luego en contacto con el PDGFR β diana preinmovilizado en perlas de Epoxy450 o en solución y se capturó con perlas de proteína A. Los complejos que se unían al PDGFR β diana inmovilizado se lavaron y se eluyeron con KOH 0.1N. La PCR se realizó con conjuntos de cebadores específicos de VL para recuperar los VL que se unían al PDGFR β diana, tanto como pares VH-VL como dominios VL no emparejados. El emparejamiento de VL se realizó durante 3 rondas, con baja rigurosidad (PDGFR β 100 nM) para las primeras 2 rondas y mayor rigurosidad (PDGFR β 10 nM) para la tercera ronda. El dominio VH XB2202 también se emparejó con la biblioteca VL de manera similar durante dos rondas. Para cada ronda de emparejamiento y selección de XB2202/VL, la rigurosidad se incrementó mediante la estrategia de cinética controlada de tasa de asociación y disociación para identificar dominios VL que se emparejaron de manera estable con el dominio VH XB2202 y mejoraron la unión de VH.

Los grupos de dominios VL identificados anteriormente se clonaron luego en el vector Blunt Zero TOPO (Invitrogen) y las secuencias de ADN que codifican VL se amplificaron de las colonias bacterianas resultantes mediante PCR usando cebadores directo e inverso M13. Luego las secuencias de ADN que codifican VL amplificadas individuales se secuenciaron. Los datos de secuencia obtenidos de los grupos de VL mostraron que un repertorio diverso de VL se enriqueció a través del procedimiento. Múltiples familias y marcos estaban presentes en el grupo. Varios VL estaban presentes como réplicas o familias. Se pudieron identificar distintas familias de VL y varias VL estuvieron presentes más de una vez. Las secuencias de VL de ejemplo identificadas usando los métodos de la invención que se emparejan con los dominios VH de unión a PDGFR β , XB1511 y XB2202 se exponen en la tabla 4 en este documento.

D. Evaluación de pares identificados de VH y VL

Para evaluar las características de los pares VH-VL identificados, se construyeron 10-12 scFv de cada grupo y se produjeron ya sea por traducción *in vitro* o por expresión de *E. coli*, seguido de purificación por afinidad.

Se realizó un ensayo ELISA de unión a PDGFR β para evaluar la unión del scFv a PDGFR β inmovilizado y para determinar la EC50. Específicamente, se inmovilizaron 2 μ g/mL de PDGFR β humano y Fc o IgG humana en PBS en placas Maxisorp a 4 °C, durante la noche. Luego la placa se lavó y bloqueó con superbloqueo. El lisado de scFv en bruto traducido *in vitro* se diluyó 1:3 en 1X PBST. Se cargaron 100 μ l del lisado scFv diluido en cada pocillo de placas Maxisorp y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El scFv que se unía al PDGFR β inmovilizado se detectó por el anticuerpo anti-flag-HRP a una dilución 1:5000 y un sustrato TMB. La placa se leyó en un lector de placas Molecular Device con ensayo de punto final a un OD de 450 nm. Como se muestra en las figuras 4, 5 y 6, en el ensayo de unión ELISA, más del 50% de los scFv generados para XB1511 y XB2202 mostraron una unión específica a PDGFR β . En contraste, los VL no emparejados solos no mostraron unión al PDGFR β (véase la figura 7).

La afinidad de varios scFv se determinó mediante un ensayo de unión en equilibrio en base a solución. Específicamente, se tradujeron 120 pmoles de ARN scFv en proteína libre con ³⁵S Met incorporado. La mezcla de reacción traducida se diluyó 3 veces en una solución reguladora de unión que contenía 1XPBS con 0.025% de tritón, 1 mg/mL de BSA y 0.1 mg/mL de ADNss. El PDGFR β humano se diluyó en la misma solución reguladora de unión a concentraciones finales desde 100 nM a 0 nM. La mezcla scFv diluida se incubó con hPDGFR β en un volumen final de 100 μ l en placas Kingfisher (ThermoFisher Scientific, 97002084). Después de la incubación, se usaron 25 μ l de perlas magnéticas de proteína A (Invitrogen) para capturar el PDGFR β de la solución. El PDGFR β capturado se lavó y se eluyó en lector Kingfisher (ThermoFisher Scientific). La cantidad de scFv (marcado con ³⁵S Met) unido al hPDGFR β inmovilizado con perlas magnéticas se contó usando un contador de centelleo y se calculó el Kd con Graph Pad Prism 5. Para el scFv derivado de XB1511 probado, 2 scFv mostraron un Kd 8 -10 veces mayor, 1 mostró un Kd 2.5 veces mayor, y 4 mostraron un Kd similar en comparación con VH XB1511 solo (Figura 8). Solo 1 scFv

mostró un K_D más bajo que VH XB1511 solo. Como se muestra en la figura 9, ambos scFv derivados de XB2202 probados mostraron un K_D aproximadamente 8-10 veces mejor en comparación con VH XB2202 solo.

Ejemplo 4. Afinidad de unión de dominios anti-PDGFR β VH a PDGFR β humano y de ratón

El grupo de dominios VH enriquecidos con PDGFR β humano y de ratón barajados en marco R4 seleccionado en el ejemplo 2 se clonó en vectores de expresión de *E. coli*, se produjo y se purificó. La cinética de unión de los dominios VH a PDFGR humano y de ratón se determinó usando resonancia de plasmón superficial en un Biacore T100. En resumen, la proteína de fusión quimérica PDGFR-hlgG1-Fc humana y de ratón se inmovilizó por separado usando un chip sensor Series CM5 (CM5) acoplado al anticuerpo monoclonal anti-hlgG1 Fc. Para cada ciclo, primero se capturó la proteína de fusión del PDGFR, seguida de la inyección de VH durante 115 segundos a una velocidad de flujo de 100 μ L/min (asociación). Inmediatamente después de la fase de asociación hay una fase de disociación de 600 segundos. La superficie se regeneró en cada ciclo con una inyección única de $MgCl_2$ 3 M (10 μ L/min, 60 segundos). Se inyectaron múltiples concentraciones del dominio VH (0.55 nM - 40 nM) y el sensorgrama resultante se analizó con el software de evaluación T100. La cinética de unión se determinó usando un ajuste de curva de unión 1:1. La cinética de unión de los clones de dominio VH XB2202 y XB2708 a PDGFR β humano y de ratón se muestra en las figuras 10, 11 y 12, respectivamente. Estos resultados muestran que XB2202 y XB2708 tienen una mejora de afinidad de 50-150 veces en comparación con XB1511 original. Específicamente, XB2202 y XB2708 tienen K_D s de 249pM y 93pM, respectivamente, y tasas de disociación (K_{off}) de 1.86×10^{-3} y 9.267×10^{-4} , respectivamente. Tanto XB2202 como XB2708 se unen a PDGFR β humano y de ratón. Es de particular interés que, aunque compartían la misma HCDR3, XB2202 se derivaba de una secuencia de línea germinal de la familia VH1 y XB2708 se derivaba de la secuencia de línea germinal de la familia VH3.

Ejemplo 5. Inhibición de la unión de PDGFBB a PDGFR β

La capacidad del dominio VH XB2202, descrito en este documento, para antagonizar la unión del ligando PDGFBB al PDGFR β humano se evaluó usando resonancia de plasmón superficial en un Biacore T100. En resumen, la proteína de fusión quimérica PDGFR-hlgG1-Fc humana se inmovilizó usando un chip sensor Series CM5 junto con el anticuerpo monoclonal anti-hlgG1 Fc 10 nM de PDGFBB humano, se inyectó a PDGFR β humano previamente capturado para obtener la unidad de respuesta de unión al 100% a PDGFR β en ausencia de VH. Para cada ciclo sucesivo, la proteína de fusión PDGFR se capturó primero y luego se inyectó el dominio VH durante 120 segundos. Después de eliminar el dominio VH no unido, se inyectaron 10 nM de PDGFBB durante 120 segundos. La superficie se regeneró en cada ciclo con una inyección única de $MgCl_2$ 3 M (10 μ L/min, 60 segundos). Se inyectaron múltiples concentraciones de VH (0.46 nM - 60 nM), el sensorgrama resultante se analizó con el software de evaluación T100 y se calculó la inhibición de unión a PDGFBB. Como se muestra en la figura 13, XB2202 inhibe la unión de PDGFBB a PDGFR β humano con una IC_{50} de menos de 5 nM.

Ejemplo 6. Inhibición de la migración de células periciticas

Se determinó la capacidad del dominio VH XB2708, descrito en este documento, para antagonizar la migración de pericitos inducida por PDGF-BB *in vitro*. Los pericitos retinianos humanos primarios se obtuvieron de Cell Systems Corporation (Kirkland, WA) y se cultivaron según las sugerencias del fabricante usando medio de crecimiento completo CSC. Se sembraron aproximadamente 125 células (2-5 pases) en cada pocillo de placas de biosensor BIND© de 384 pocillos recubiertas con fibronectina en plasma humano (5 μ g/ml en PBS) y bloqueadas con BSA (1% en PBS) en medio sin suero que contiene 0.1% BSA. Se permitió que las células se adhirieran y luego se murieran de hambre durante la noche. Después de la falta del suero, las células se incubaron durante 1 hora con diversas concentraciones de VH contra el receptor PDGFR β humano en una incubadora de cultivo de tejidos. La migración se estimuló al final de la preincubación de anticuerpos mediante la adición de PDGF-BB a una concentración final de 5 ng/ml en medio sin suero. Las imágenes de los pocillos se obtuvieron usando un escáner BIND© cada 18 minutos durante 20 horas en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C con 5% de CO_2 y > 75% de humedad. Los datos recopilados se analizaron usando un algoritmo de identificación y seguimiento de centroides en base a Matlab para calcular la velocidad de las células entre las horas 10 y 16. Los resultados expuestos en la figura 14 muestran que XB2708 puede antagonizar la migración de pericitos inducida por PDGF-BB con una IC_{50} de 0.54nM.

Ejemplo 7. Conversión de pares VH-VL a IgG heterotetramérica y demostración de actividad biológica

VH XB1511 y VL D8 se expresaron juntos en una IgG heterotetramérica en células 293T. El sobrenadante del cultivo celular se recogió después de 48 horas y 96 horas y la IgG expresada se purificó con perlas de agarosa con proteína A. La IgG se produjo a 8 mg/L sin ninguna optimización. Para evaluar la actividad biológica de la IgG XB1511/D8, se sembraron fibroblastos de prepucio humano HFF-1 en biosensores BIND de 384 pocillos y se les permitió unirse durante la noche en medios sin suero. Las células de fibroblastos se estimularon luego con 5 ng/mL o 10 ng/mL de ligando PDGFBB y se les permitió migrar durante 18 horas en presencia o ausencia de IgG XB1511/D8 100 nM. Las imágenes de barrido BIND se capturaron cada 15 minutos y las herramientas de análisis de software se usaron para medir las longitudes de seguimiento de las respuestas de migración de células individuales. La longitud de seguimiento está representada por un "mapa de calor" de azul (sin migración) a rojo (migración máxima). Como se muestra en la figura 15, la IgG XB1511/D8 fue capaz de bloquear completamente la migración inducida por PDGFBB de fibroblastos humanos.

Ejemplo 8. Termoestabilidad de scFv

Se determinó la termoestabilidad del VH XB2202 y XB2202/A4 scFv. Específicamente, se incubaron 1 mg/mL de XB2202 y XB2202-A4 a 4 °C, 37 °C, 60 °C y 70 °C, durante 12 horas y se realizó un ELISA de unión a PDGFR β para probar la actividad de unión de la proteína después de la incubación. Como se muestra en la figura 16, el dominio VH XB2202 perdió una actividad de unión PDGFR β significativa después de la incubación a 60 °C y perdió completamente la actividad de unión después de la incubación a 70 °C. La T_m de XB2202 se midió en aproximadamente 62 °C. Por el contrario, el scFv XB2202/A4 estaba completamente activo después de 12 horas de incubación a 70 °C, lo que indica que la T_m del scFv XB2202 era superior a 70 °C.

Ejemplo 9. Expresión, purificación y concentración de anticuerpos de IgG1

Los pares VH/VL XB1511/D8 y XB2202/A4 se expresaron por separado como anticuerpos IgG1 heterotetraméricos de longitud completa en células 293T y se purificaron. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos IgG1 XB1511/D8 y XB2202/A4 se exponen en la tabla 7, en este documento.

Los sobrenadantes del cultivo celular se obtuvieron por filtración y los anticuerpos expresados se purificaron usando un esquema de purificación de dos etapas. Específicamente, se realizó la purificación por afinidad de proteína A, con elución unida a anticuerpo a pH 3.5. El pH del eluato de proteína A se ajustó a pH 7 usando Tris 1 M, y se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico usando una columna HiTrap Q XL (GE Healthcare). El anticuerpo purificado se almacenó en PBS a pH 7.

Tabla 7. Secuencias de aminoácidos de los pares VH/VL XB1511/D8 y XB2202/A4 formateados como anticuerpos de IgG1 heterotetraméricos de longitud completa

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos (secuencias de señal subrayadas)	SEQ ID NO.
XB1511 IgG1	<u>GWSLILLFLVAVATRVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> SCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAIHGGDRSYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLY SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	505
D8 Ckappa	<u>DFQVQIISFLLISASVIMSRGEIVMTQSPGTLTLSPGEGATL</u> SCRASQSVTSN YLAWYQQRPQGAPRLLIYDASNRAITGIPDRFSGSGFGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYVNSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTQKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	506
XB2202 IgG1	<u>GWSLILLFLVAVATRVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRV</u> SCKASGGTFSSRHAIS WVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINADESTSTVYMEMSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLY SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	507
A4 Ckappa	<u>DFQVQIISFLLISASVIMSRGDVMTQSPSSLSASVGD</u> RVTTITCQASQDISNW LNWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTITSLQPEDIAT YYCQQYNNVLRITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTQKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	508

El nivel de expresión de anticuerpos y la concentración de anticuerpos después de cada etapa de purificación se determinaron midiendo el A₂₈₀ de la solución de anticuerpos. La pureza y la calidad de los anticuerpos purificados se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SEC-HPLC). Los resultados de estos experimentos se exponen en la tabla 8, en este documento. Estos datos muestran que cuando los pares VH/VL XB1511/D8 y XB2202/A4 se formatean como anticuerpos IgG1 heterotetraméricos de longitud

completa, los anticuerpos resultantes son altamente fabricables ya que se expresan en niveles altos, se purifican fácilmente a una alta pureza, y exhibir poca agregación.

Tabla 8. Análisis de expresión y purificación de anticuerpos IgG1 XB1511/D8 y XB2202/A4.

Anticuerpo	Volumen de cultivo	Nivel de expresión del anticuerpo	Cantidad de anticuerpo después de la purificación de proteína A	Cantidad de anticuerpo después de la purificación de intercambio iónico	% de recuperación del anticuerpo después de la purificación en 2 etapas	% de pureza del anticuerpo	% de agregados de anticuerpos
XB1511/D8 IgG1	2.0L	24mg/L	46mg	44mg	97.8%	95.8%	2.4%
IgG1 XB2202/A4	1.4L	47mg/L	62mg	54mg	87%	96.9%	2.5%

- 5 Los anticuerpos de IgG1 XB1511/D8 y XB2202/A4 purificados se analizaron adicionalmente para determinar su capacidad de concentración. Específicamente, las soluciones de cada anticuerpo se concentraron a 50 mg/ml usando columnas de centrifugación de ultrafiltración Centricon con límites de corte de 10 kDa y 30 kDa. La integridad de la solución concentrada se analizó por SEC-HPLC. A partir de este análisis, se determinó que la solución de 50 mg/ml de IgG1 XB1511/D8 tenía una pureza de aproximadamente el 96% y contenía aproximadamente el 2.4% de agregados de anticuerpos, mientras que la solución de 50 mg/ml de IgG1 XB2202/A4 tenía una pureza de aproximadamente 97.8 % y contenía aproximadamente 2.2% de agregados de anticuerpos. Estos datos demuestran que los anticuerpos IgG1 XB1511/D8 y XB2202/A4 son altamente estables en una solución concentrada.

Ejemplo 10. Termoestabilidad de los anticuerpos IgG1 XB1511/D8 y XB2202/A4

- 15 La termoestabilidad de los anticuerpos de IgG1XB1511/D8 y XB2202/A4 se determinó usando un ensayo en base a fluorescencia. Específicamente, se mezclaron 5 mg/ml de IgG1 XB1511/D8 purificado, IgG1 XB2202/A4 o control de IgG1 humana con colorante naranja Sypro (Sigma) y la temperatura de la mezcla aumentó en incrementos de 1 grado de 25 °C a 95 °C. El colorante naranja Sypro se incorpora a la IgG cuando aumenta la temperatura y se desarrolla la IgG. La señal fluorescente producida por la asociación del colorante naranja Sypro con las IgG se controló usando un instrumento BioRad CFX96. En este ensayo, la regresión negativa de la señal naranja Sypro se usó para identificar el punto de fusión máximo (esto es, T_m) para cada proteína.

- 25 A partir de este análisis, se determinó que XB1511/D8 y XB2202/A4 tienen temperaturas de fusión (T_m) de 67 °C a 70 °C, respectivamente. Esto se comparó bien con el anticuerpo de control IgG1 humano que exhibió una T_m de 72 °C. Estos datos demuestran que VH y los pares VH/VL de la invención se pueden formatear en moléculas de IgG de longitud completa altamente termoestables.

Ejemplo 11. Afinidades de unión de los anticuerpos VH XB2202, scFv e IgG1 a humanos

- 30 La cinética de unión del dominio VH XB2202, XB2202/A4 scFv e IgG1 XB2202/A4 a PDGFR humana se determinó usando resonancia de plasmón superficial en un Biacore T100. En resumen, la proteína de fusión química recombinante humana PDGFR-hIgG1-Fc (R&D, # 385-PR-100/CF) se inmovilizó en un chip sensor Series CM5 junto con el anticuerpo monoclonal anti-hIgG1 Fc (para los ensayos VH y ScFv) o anticuerpo anti-6His (para el ensayo de IgG). El dominio VH XB2202, XB2202/A4 scFv e IgG1 XB2202/A4 se hicieron volar sobre la superficie a 50 o 100 ul/min durante 3 minutos a diferentes concentraciones (75, 50, 25, 10, 5 y 1 nM) y se les permitió disociarse durante 10 minutos. Los datos se analizaron usando el software de análisis Biacore T100 usando un modelo 1: 1. Se verificó el transporte de masas y se evitó para permitir mediciones precisas. Todos los datos tuvieron doble referencia de acuerdo con el protocolo estándar Biacore.

- 35 La cinética de unión del dominio VH XB2202, los anticuerpos XB2202/A4 scFv e IgG1 XB2202/A4 al PDGFR β humano se muestra en la tabla 9, en este documento. Estos datos muestran que el dominio VH XB2202, XB2202/A4 scFv e IgG1 XB2202/A4 tienen cada uno una alta afinidad de unión por PDGFR β . Es de particular importancia que XB2202/A4 scFv e IgG1 XB2202/A4 exhiben una tasa de disociación mejorada ($1.54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $1.56 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) en comparación con la del dominio VH XB2202 no emparejado solo ($2.95 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Tabla 9. Cinética de unión del dominio VH XB2202, XB2202/A4 scFv e IgG1 XB2202/A4 a PDGFR β humano

Anticuerpo	tasa de asociación ($M^{-1}s^{-1}$)	tasa de disociación (s^{-1})	Kd (M)
VH XB2202	1.30×10^7	2.95×10^{-3}	2.27×10^{-10}
XB2202/A4 ScFv	7.06×10^5	1.54×10^{-3}	2.18×10^{-9}
IgG1 XB2202/A4	9.80×10^5	1.56×10^{-3}	1.59×10^{-9}

Ejemplo 12. Análisis funcional de anticuerpos anti-PDGFR β usando modelos de ratón *in vivo*

5 La capacidad de los anticuerpos anti-PDGFR descritos en este documento para inhibir la vascularización inducida por PDGF *in vivo* se evalúa usando el modelo de vasculatura de la retina en desarrollo, el modelo de neovascularización corneal y/o el modelo de neovascularización coroidea descrito en Nobuo et al. Am. J. Path, (2006) 168(6), 2036-2052. En estos ensayos, los anticuerpos se administran a ratones como dominios VH, scFv y/o IgG de longitud completa.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de unión aislado que consiste en un dominio variable pesado (VH) que se une específicamente a PDGFR β , en el que el dominio VH comprende secuencias de aminoácidos CDR3, CDR2 y CDR1, en el que
 - (i) la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, la CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, y la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 35 y en el que el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 321-324, o
 - (ii) la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, la CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25, y la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46 y en el que el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 345 y 360,
 y en el que el polipéptido de unión aislado se une al PDGFR β con un Kd de menos de 250 pM medido por resonancia de plasmón superficial, preferiblemente con un Kd de menos de 100 pM medido por resonancia de plasmón superficial.
2. El polipéptido de unión de la reivindicación 1, que inhibe la actividad de PDGFR β , en el que, preferiblemente, la actividad de PDGFR β se inhibe antagonizando la unión de PDGF a PDGFR β , o la actividad de PDGFR β se inhibe antagonizando la dimerización de PDGFR β .
3. El polipéptido de unión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una o más de las siguientes características:
 - se une a PDGFR β con una tasa de disociación de menos de 10^{-3} s^{-1} ;
 - se une específicamente a PDGFR β de ratón y humano;
 - antagoniza la unión de PDGF al PDGFR β con una IC50 de menos de 5 nM;
 - inhibe la fosforilación de tirosina inducida por ligando de PDGFR β con una IC50 de menos de 4 nM;
 - inhibe la migración del pericito retiniano con una IC50 de menos de 6 nM;
4. Un ácido nucleico aislado que codifica el dominio VH aislado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 4.
6. Una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 5.
7. Un método de producción de un polipéptido de unión que se une específicamente al PDGFR β humano, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 6 en condiciones tales que un polipéptido de unión que se une específicamente al PDGFR β humano es producido por la célula huésped.
8. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
9. Una composición farmacéutica de la reivindicación 8 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno, preferiblemente una enfermedad o trastorno asociado con PDGFR β , en el que, preferiblemente, la enfermedad o trastorno es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o cáncer.

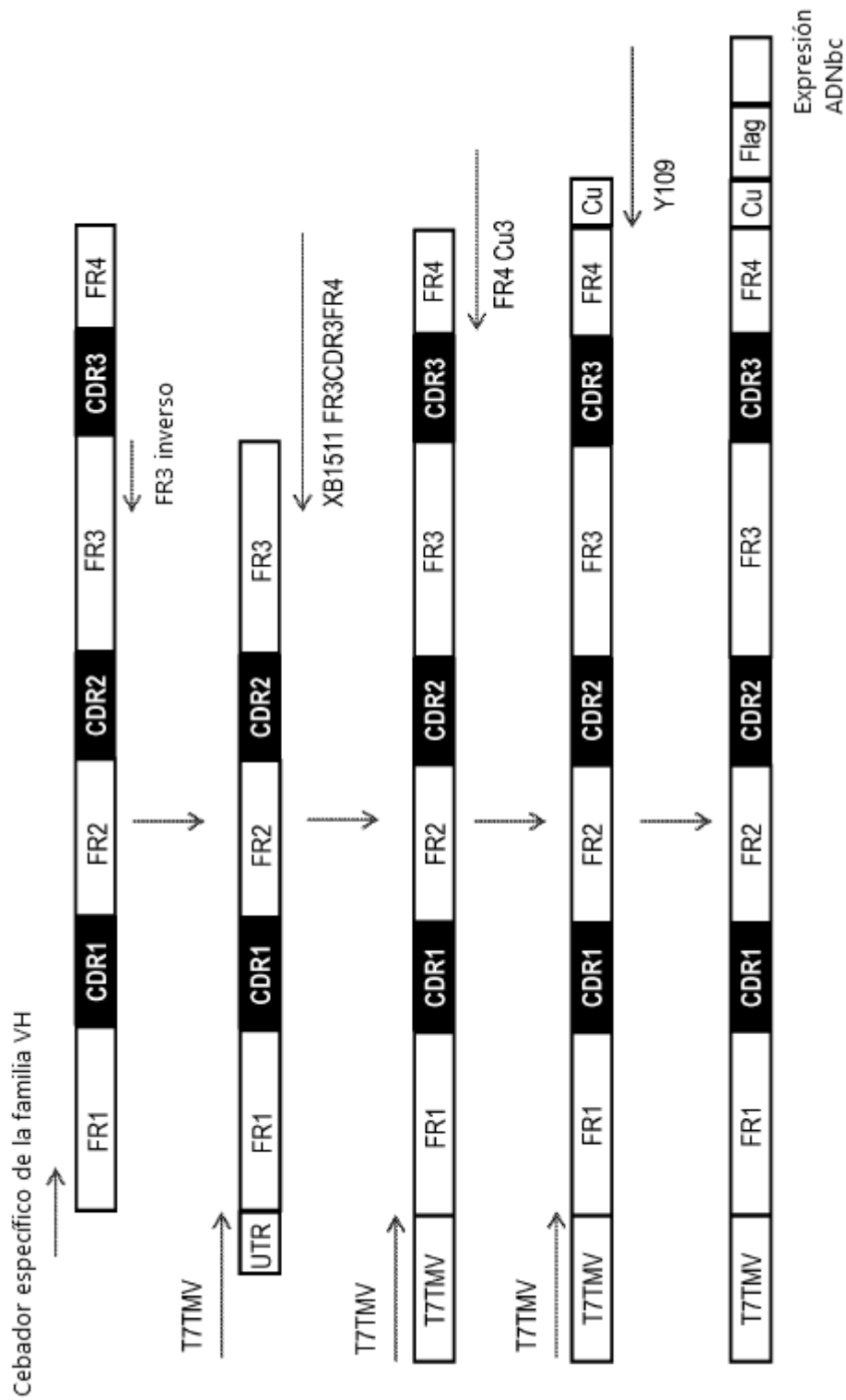


Fig. 1

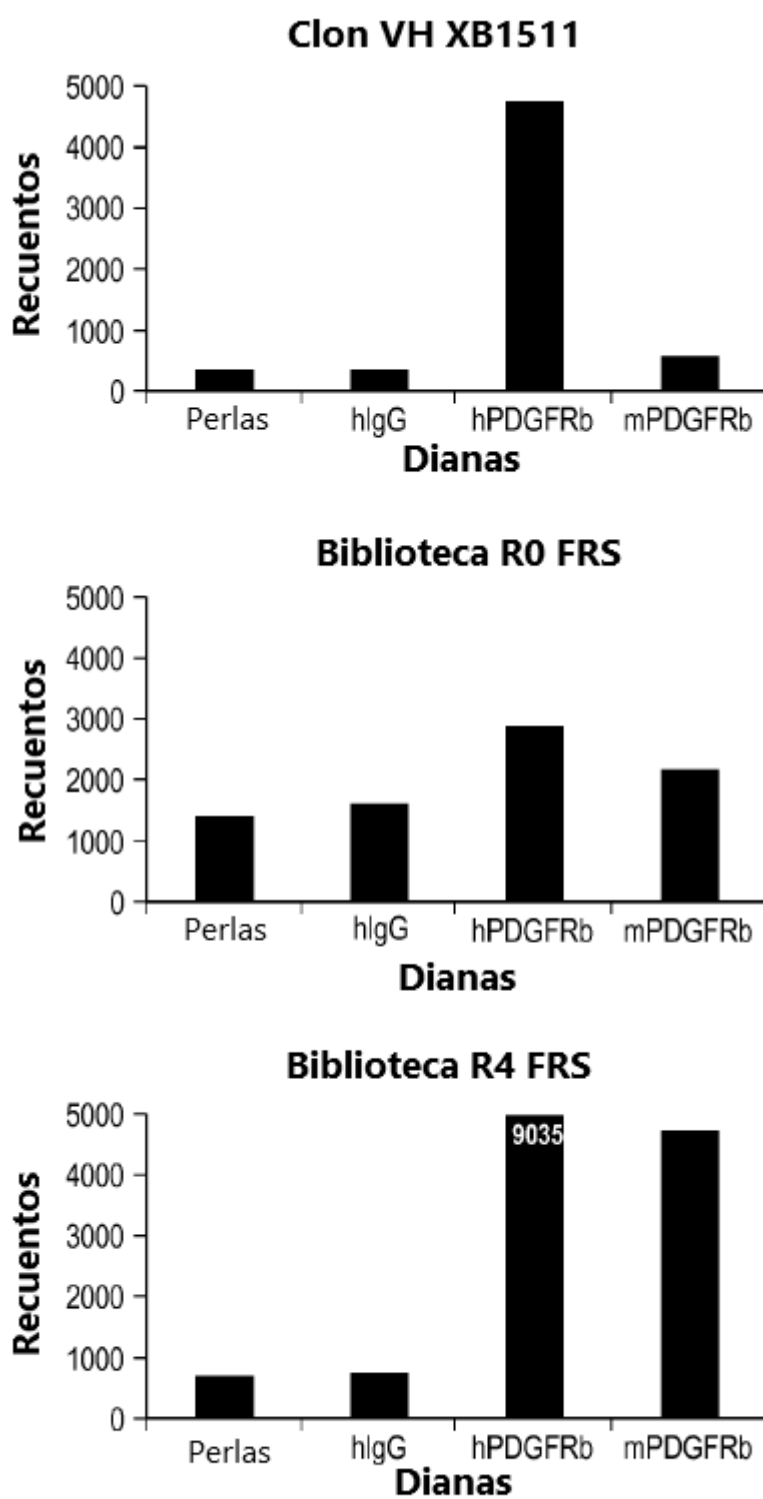


Fig. 2

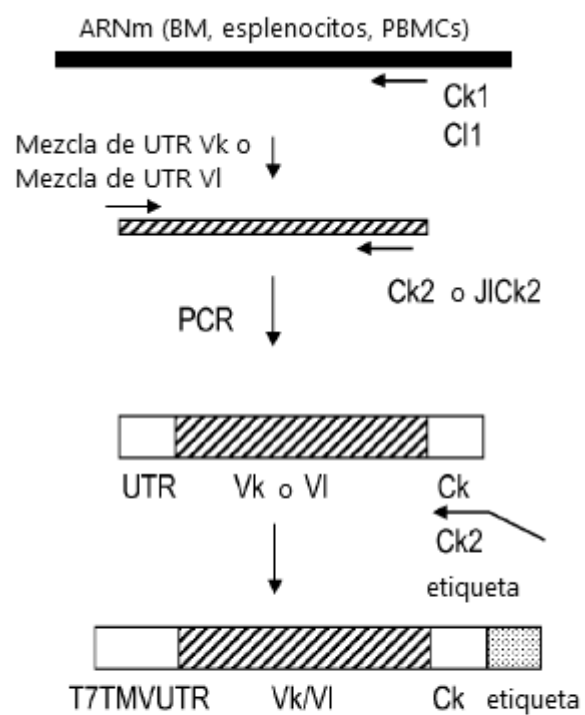
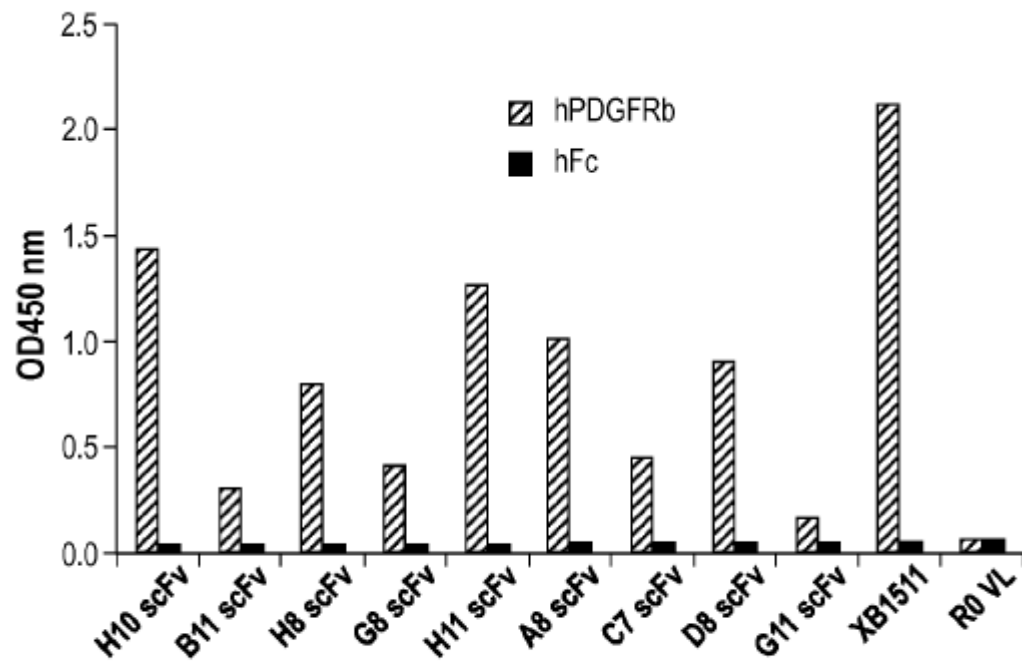


Fig. 3

**Fig. 4**

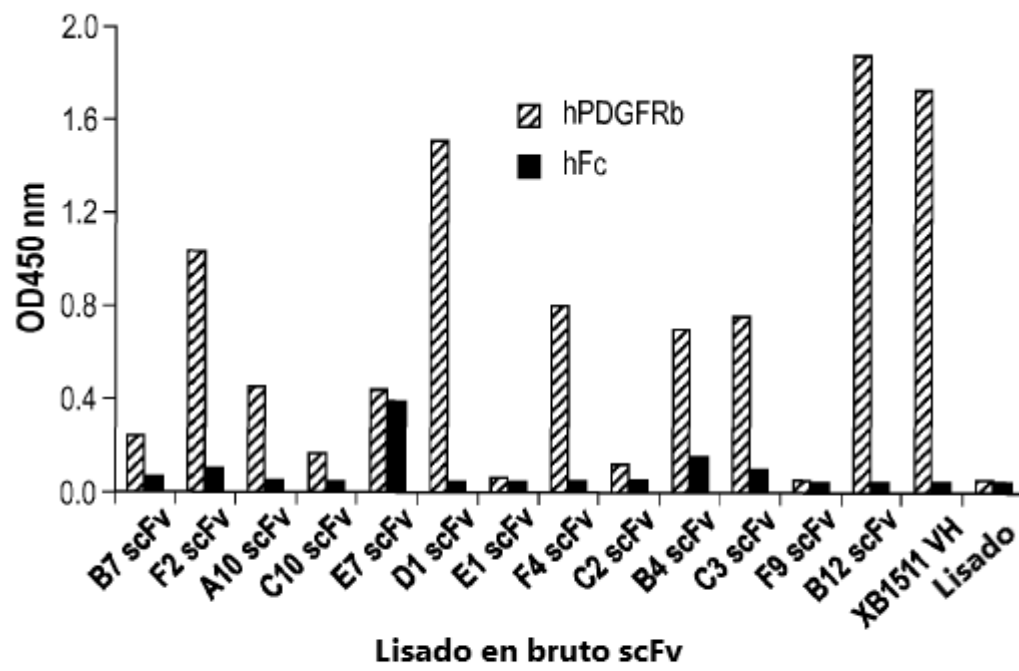


Fig. 5

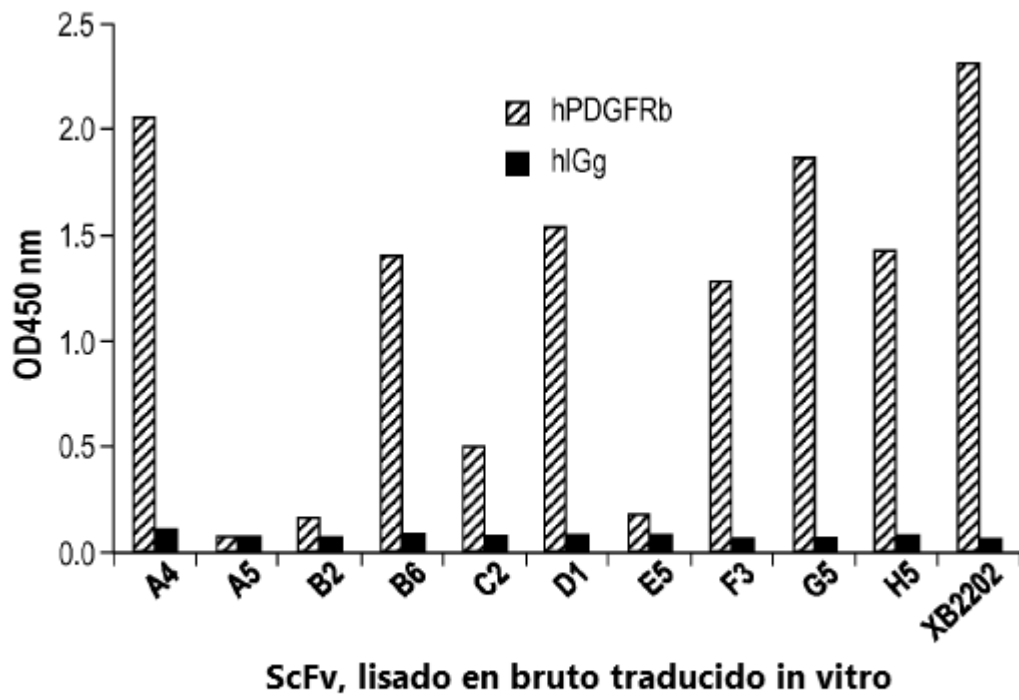


Fig. 6

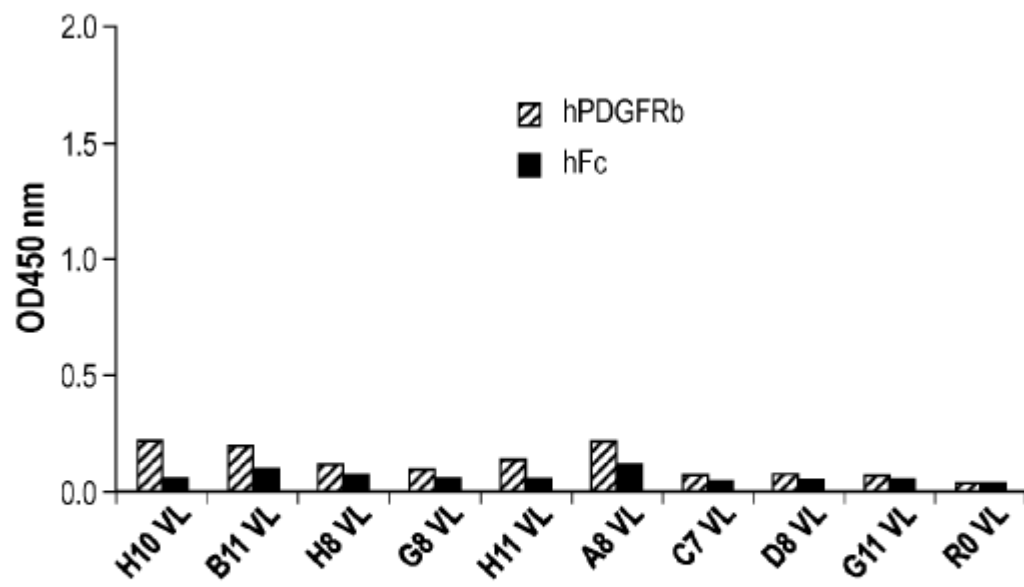
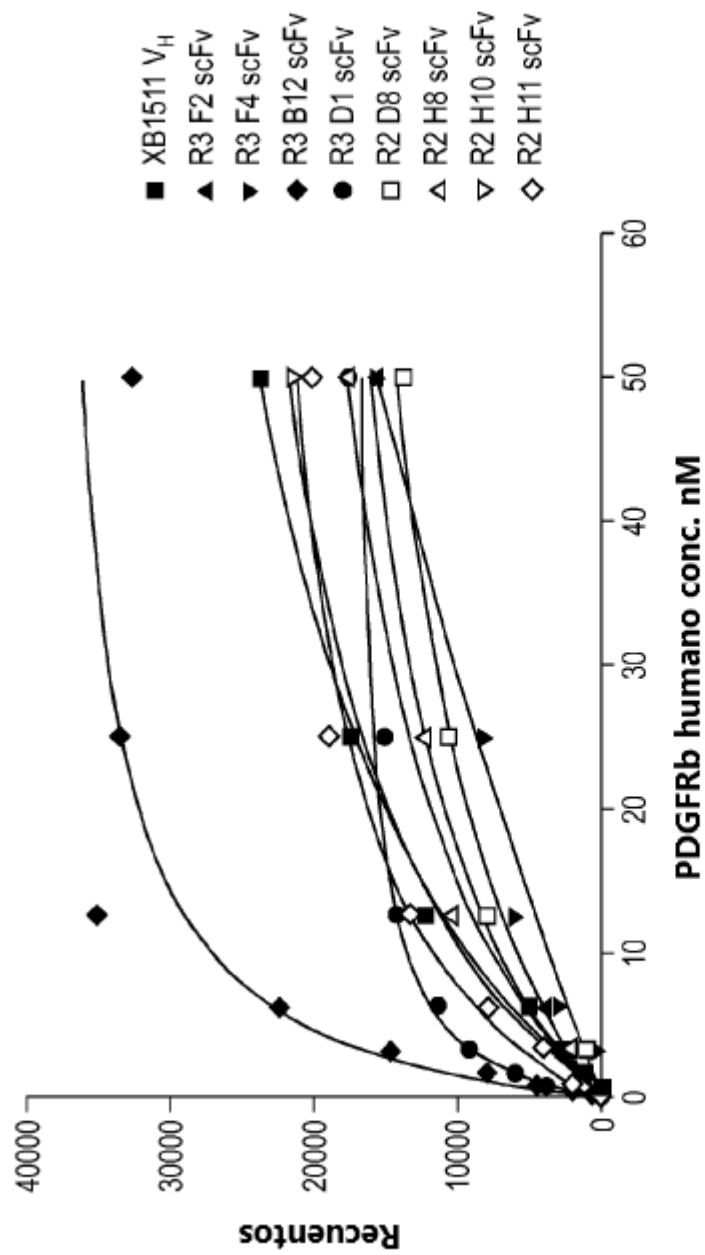


Fig. 7



	XB1511 V _H	R3 F2 scFv	R3 F4 scFv	R3 B12 scFv	R3 D1 scFv	R2 D8 scFv	R2 H8 scFv	R2 H10 scFv	R2 H11 scFv
K _D (nM)	31.88	23.12	223.5	4.579	3.155	28.32	24.45	23.2	12.86

Fig. 8

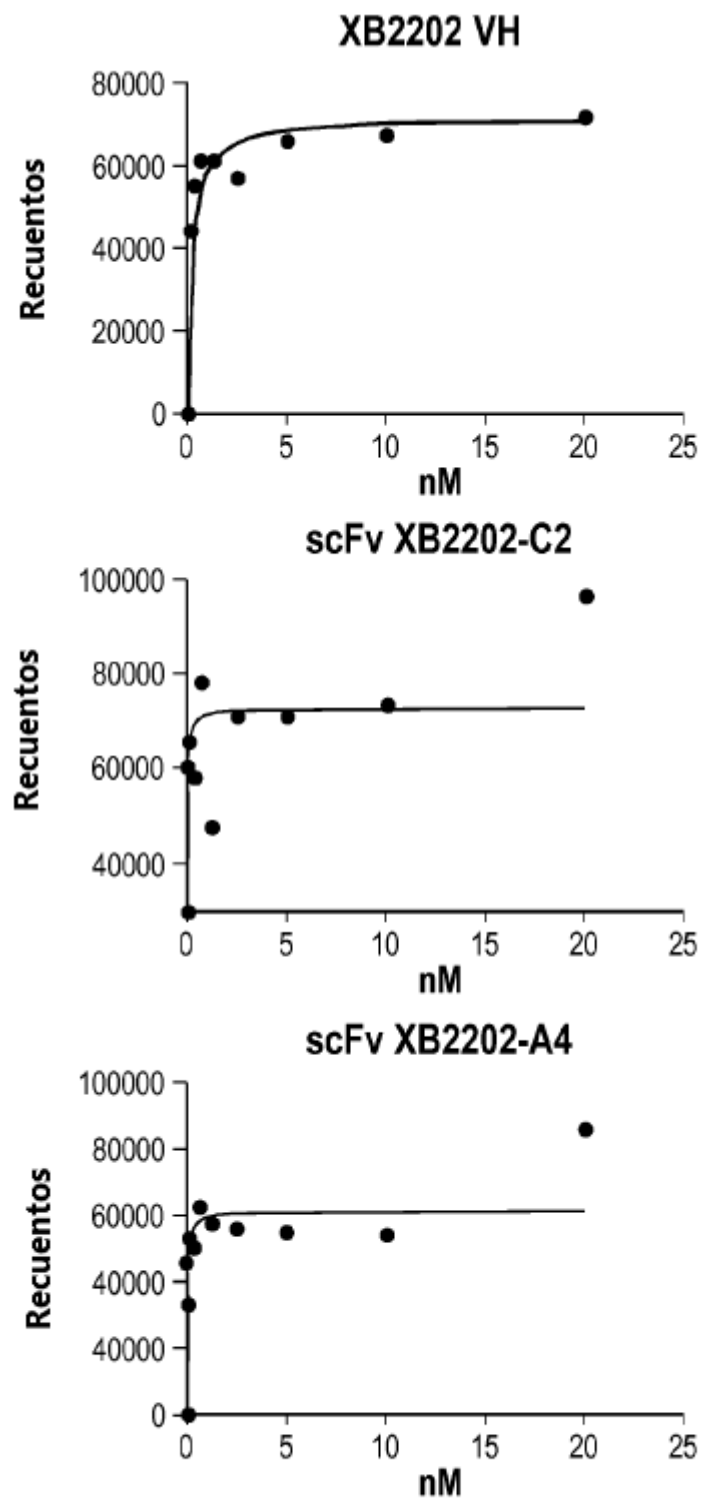


Fig. 9

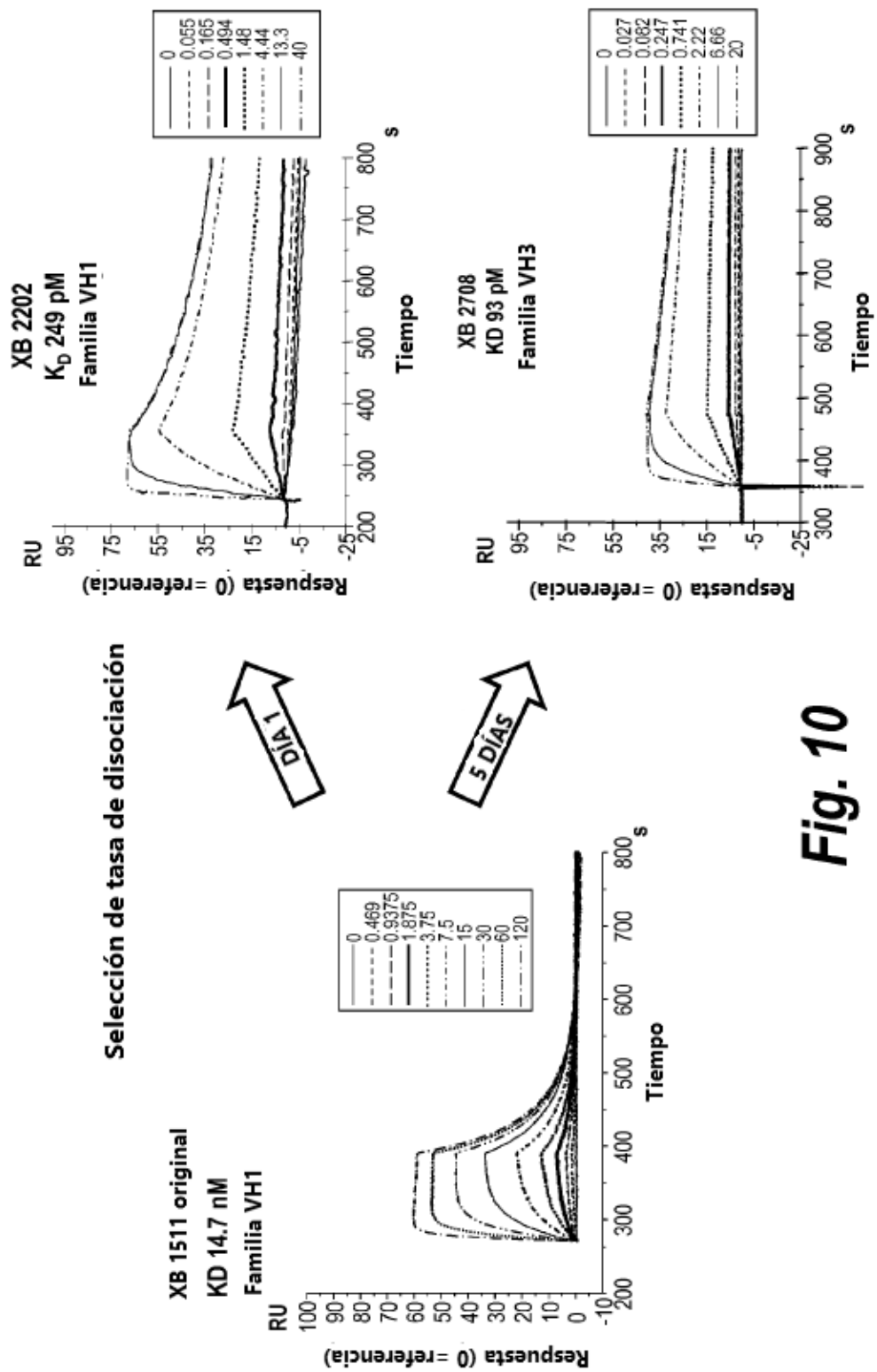


Fig. 10

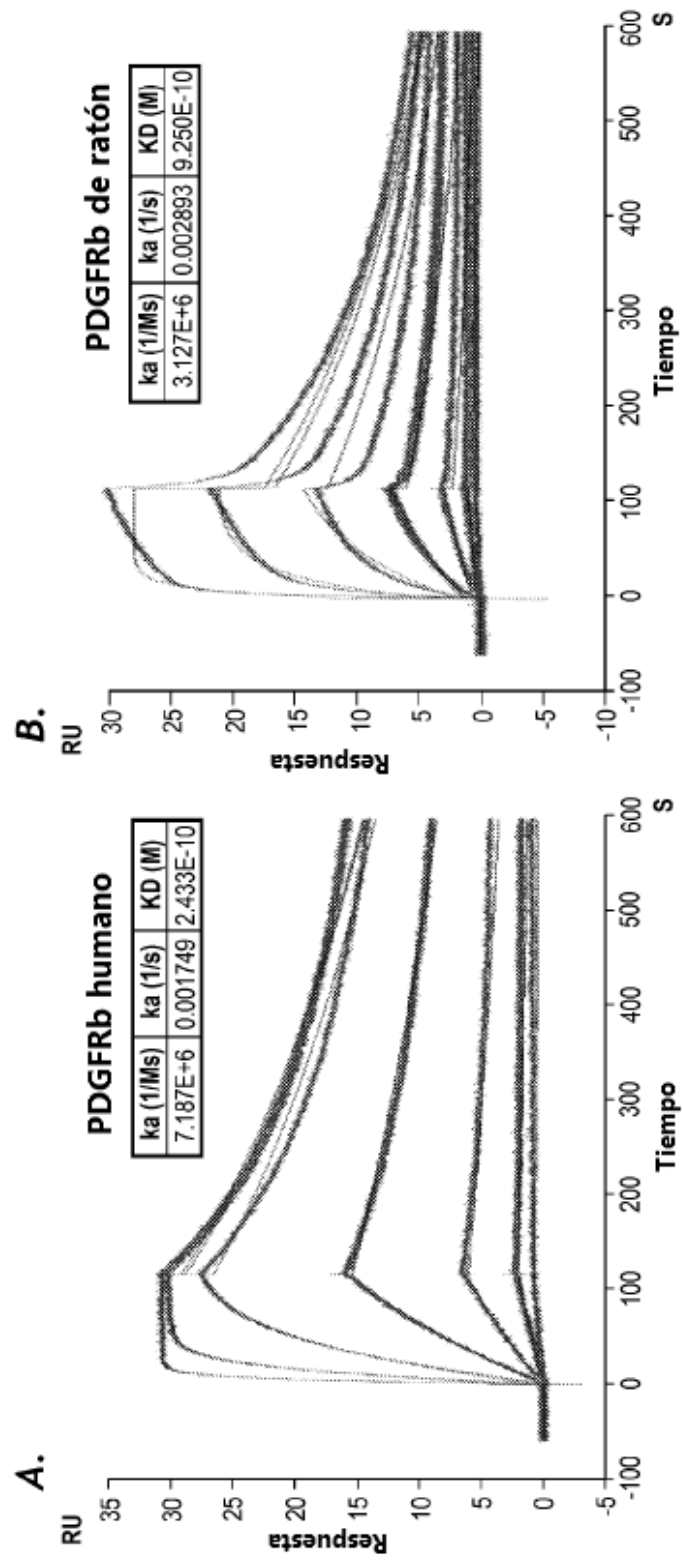


Fig. 11

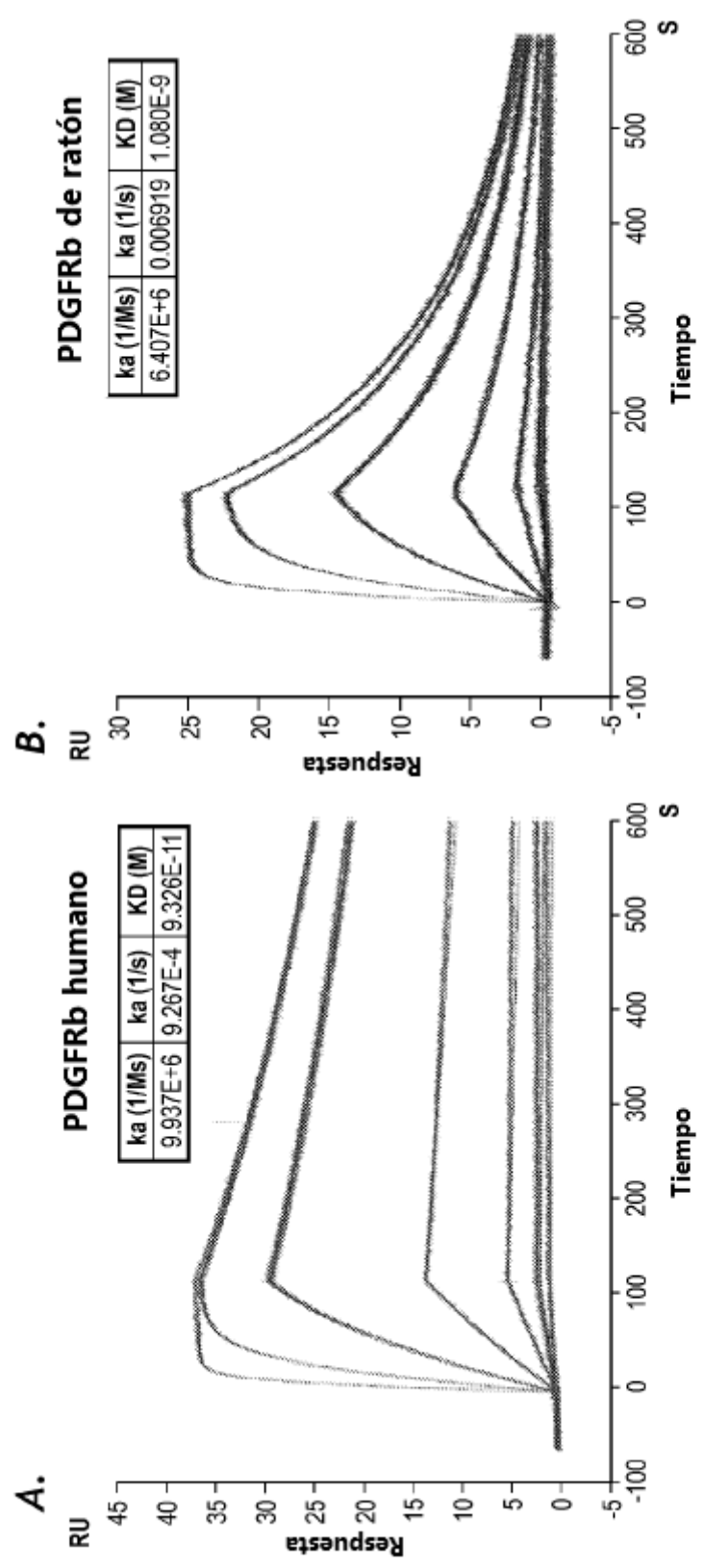


Fig. 12

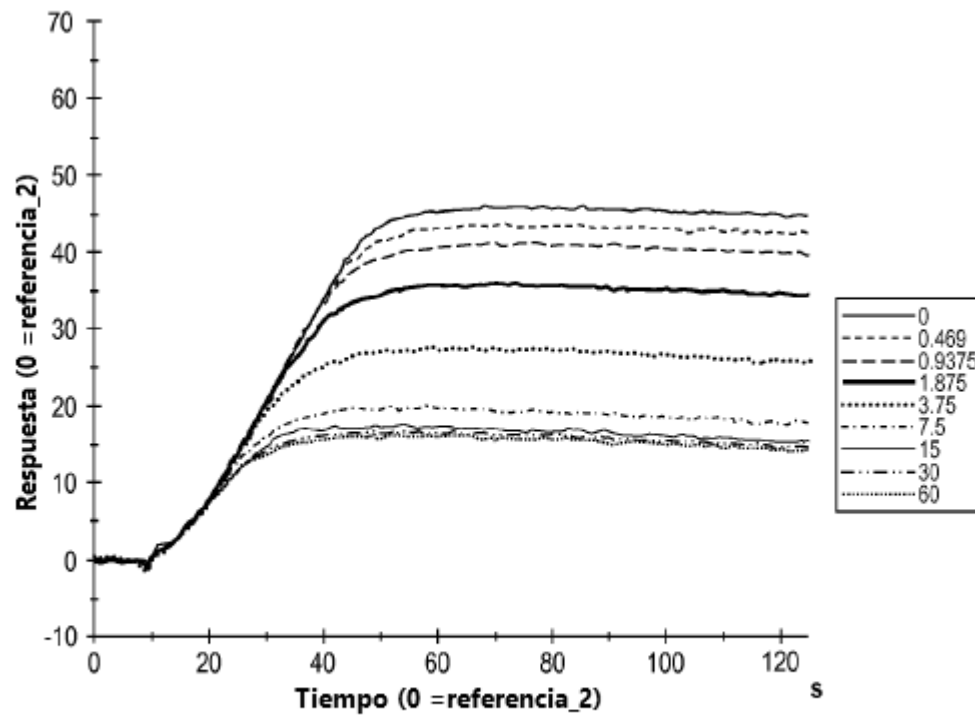


Fig. 13

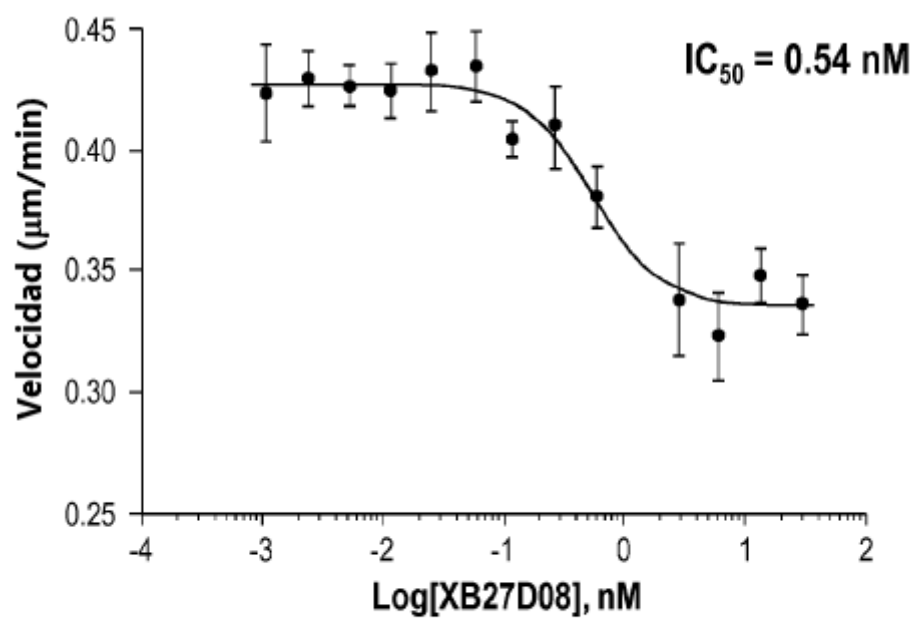


Fig. 14

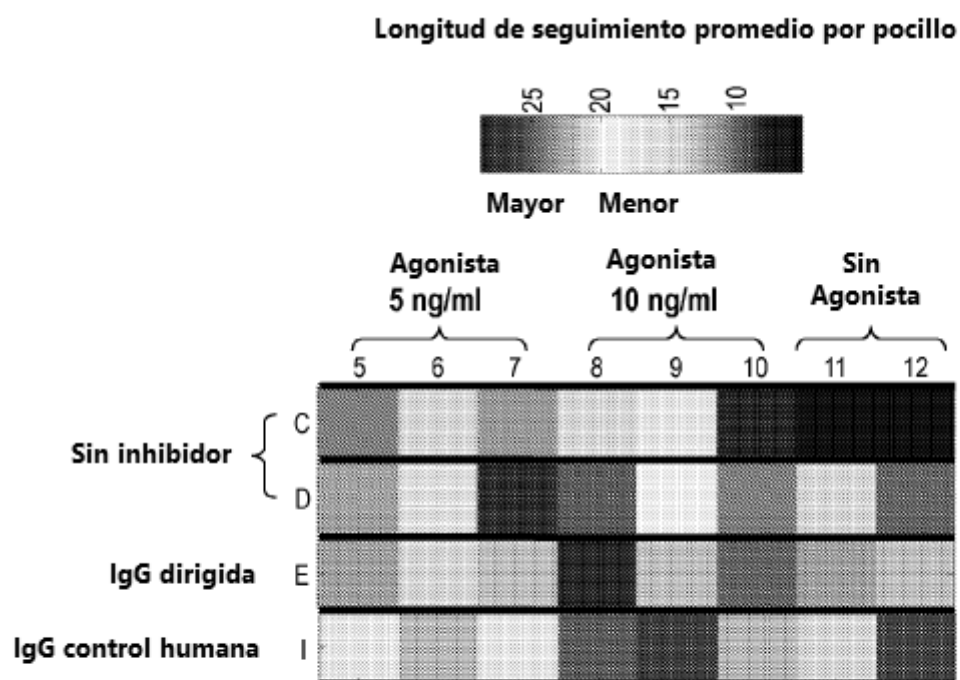


Fig. 15

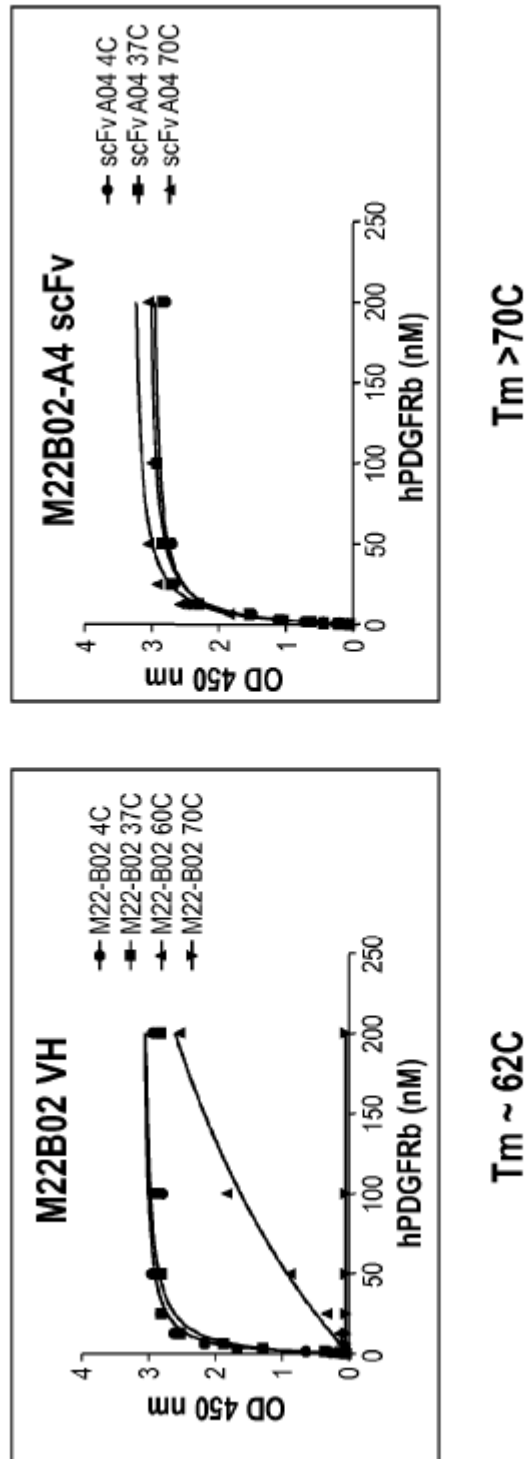


Fig. 16