SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SIC

CSA836196
Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda

**DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

**División de Nuevas Creaciones**

SOLICITUD

# PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 10-67360

54. **TITULO** COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y METODOS

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC. y AFFITECH RESEARCH AS

**DOMICILIO** TUSTIN, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA y OSLO, NORUEGA, respectivamente

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.**



Radicado
09-06-2010

AS: 113.937

# PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-067350- -00000-0000
Fecha: 2010-06-03 16:39:20 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 523

## FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

**1 SOLICITUD DE:**

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

**2 SOLICITANTE**

Nombre: **PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC.** y **AFFITECH RESEARCH AS**
Dirección: Franklin Avenue Suite 100 Tustin, CA 92780, US y Oslo Research Park, Gaustadelleen 21, N-0349 Oslo, Noruega.
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Noruega
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América y Noruega
Teléfono: Fax:
E-mail

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

**3 REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia.
Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200
E-mail:

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder genéral para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder). _____

**4 INVENTOR (ES) (72)**

**Nombre:** Anita KAVLIE, Kyle SCHLUNEGGER.

**Dirección:** Stromsborgveien 39H, N-0287 Oslo, Noruega; 27912 Perales, Mission Viejo, CA 92692, United States of America (respectivamente).
**Nacionalidad o Domicilio:** Noruega y Estados Unidos de América (respectivamente).

**5 PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/GB2008/003745 Fecha 07.11.2008
Publicación Internacional No WO 2009/060198 A1 Fecha 14.05.2009

**6 Título (54):** COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y MÉTODOS

**7 Clasificación Internacional (51):** _____

**8 Prioridad**

SI ☒ NO ☐

| (33) País de Origen | (32) Fecha | (31) Número de Solicitud |
|---|---|---|
| US | 09.11.2007 | 60/987,015 |
| US | 16.10.2008 | 61/106,047 |
| US | 24.10.2008 | 61/108,023 |

**9 Comprobante de pago No.** 10-26.241; 10-29.174 **Fecha** 01-06-2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

**10** **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $ 554.000
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- [ ] Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales. $ 1'300.000 (50*$26.000)

**11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**

**12** Solicito la concesión de la patente,

**NOMBRE:** **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

**FIRMA:**

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

113937 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 26,241
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 10-067350- -00000-0000**

Fecha: 2010-06-03 16:39:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

***** C O N S I G N A C I O N *****

| DEPOSITANTE | TIPO PAGO | BANCO | CUENTA | No. PAGO | FECHA PGO | Vr. PAGO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BRIGARD & CASTRO LTDA | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 80662256 | 07/04/2010 | 67,384,800.00 |

***** C O N C E P T O *****

| CANT. | RENTISTICO | CONCEPTO | | TOTAL CONCEPTO |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I | 99 | OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS | 1,300,000.00 |
| | | | TOTAL : $ | 1,300,000.00 |

SON: UN MILLON TRESCIENTOS PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

4

113937

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 29,174
FECHA : ABRIL 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-067350- -00000-0000
Fecha: 2010-06-03 16:39:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

***** C O N S I G N A C I O N *****

| DEPOSITANTE | TIPO PAGO | BANCO | CUENTA | No. PAGO | FECHA PGO | Vr. PAGO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BRIGARD & CASTRO LTDA | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 80662271 | 15/04/2010 | 44,633,600.00 |

***** C O N C E P T O *****

| CANT. | RENTISTICO | CONCEPTO | TOTAL CONCEPTO |
|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 554,000.00 |
| | | TOTAL : $ | 554,000.00 |

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/060198 A1

(51) International Patent Classification:
*A61K 39/395* (2006.01) *C07K 16/22* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2008/003745

(22) International Filing Date:
7 November 2008 (07.11.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

| | | |
|---|---|---|
| 60/987,015 | 9 November 2007 (09.11.2007) | US |
| 61/106,047 | 16 October 2008 (16.10.2008) | US |
| 61/108,023 | 24 October 2008 (24.10.2008) | US |


(71) Applicants: **PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 14272 Franklin Avenue, Suite 100, Tustin, CA 92780 (US). **AFFITECH AS** [NO/NO]; Oslo Research Park, Gaustadallèen 21, N-0349 Oslo (NO).

(71) Applicant *(for BB only)*: **OWEN, Deborah Jane** [GB/GB]; Frank B. Dehn & Co., St. Bride's House, 10 Salisbury Square, London EC4Y 8JD (GB).

(72) Inventors: **KAVLIE, Anita**; Stromsborgveien 39H, N-0287 Oslo (NO). **SCHLUNEGGER, Kyle**; 27912 Perales, Mission Viejo, CA 92692 (US).

(74) Agent: **FRANK B. DEHN & CO.**; St Bride' s House, 10 Salisbury Square, London EC4Y 8JD (GB).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

WO 2009/060198 A1

(54) Title: ANTI-VEGF ANTIBODY COMPOSITIONS AND METHODS

(57) Abstract: Disclosed are human antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two primary VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new human antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate compositions and methods using the new VEGF-specific human antibodies are also provided.

File Copy

PCT/GB2008/003745

**PATENT COOPERATION TREATY**

# ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

# PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

DEHNS
St Bride' s House
10 Salisbury Square
London EC4Y 8JD
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
30 April 2010 (30.04.2010)

Applicant's or agent's file reference
69.93964/03

**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.
PCT/GB2008/003745

International filing date *(day/month/year)*
07 November 2008 (07.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

AFFITECH AS
Oslo Research Park
Gaustadallèen 21
N-0349 Oslo
Norway

State of Nationality: NO
State of Residence: NO
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

AFFITECH RESEARCH AS
Oslo Research Park
Gaustadallèen 21
N-0349 Oslo
Norway

State of Nationality: NO
State of Residence: NO
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 40

Authorized officer
Sanvincenti Guido
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL**
**Oficina Internacional**

**OMP PCT**

**(43) Fecha de Publicación Internacional:**
*14 de Mayo de 2009 (14.05.2009)*

**(10) Número de Publicación Internacional:**
**WO 2009/060198 A1**

**(51) Clasificación Internacional de Patentes [7]:**
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(21) Número de Solicitud Internacional:** PCT/GB2008/003745

**(22) Fecha de Presentación Internacional:**
07 de Noviembre de 2008 (07.11.2008)

**(25) Idioma Presentado:** Inglés

**(26) Idioma de Publicación:** Inglés

**(30) Fecha de Prioridad:**
60/987,015 09 de Noviembre de 2007 (09.11.2007) US
61/106,047 16 de Octubre de 2008 (16.10.2008) US
61/108,023 24 de Octubre de 2008 (24.10.2008) US

**(71) Solicitante: PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 14272 Franklin Avenue Suite 100 Tustin, CA 92780 (US). **AFFITECH AS** [NO/NO]; Oslo Research Park, Gaustadelleen 21, N-0349 Oslo (NO).

**(71) Solicitante:** (para BB únicamente): **OWEN, Deborah Jane** [GB/GB]; Frank B. Dehn & Co., St. Bride's House, 10 Salisbury Square, London EC4Y 8JD (GB).

**(72) Inventores: KAVLIE, Anita**; Strombsborgveien 39H, N-0287 Oslo (NO). **SCHLUNEGGER, Kyle**; 27912 Perales, Mission Viejo, CA 92692 (US).

**(74) Agente: FRANK B. DEHN & CO.**; St Bride's House 10 Salisbury Square London EC4Y 8JD (GB).

**(81) Estados Designados:** (amenos que se indique de otro modo, para cada caso de protección nacional disponible): AE, AG AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

**(84) Estados Designados:** (a menos que se indique de otro modo, para cada caso de protección regional disponible): patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**
- con el reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del tiempo límite para enmendar las reivindicaciones y para republicar en el caso de la recepción de las enmiendas
- con parte de listado de secuencias de la descripción publicada de forma separada en forma electrónica y disponible a petición de la Oficina Internacional

WO 2009/060198 A1

## (54) Título: COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y MÉTODOS

**(57) Resumen:** Se describen anticuerpos humanos que inhiben de manera específica la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores primarios de VEGF. Los anticuerpos inhiben de manera efectiva la angiogénesis e inducen regresión tumoral, y aún tienen seguridad mejorada debido a su especificidad. La presente invención proporciona de este modo nuevas composiciones, métodos y protocolos combinados, basados en anticuerpos humanos, para tratar cáncer y otras enfermedades angiogénicas. También se proporcionan composiciones y métodos ventajosos de inmunoconjugados que usan los nuevos anticuerpos humanos específicos de VEGF.

# COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y METODOS

## Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de anticuerpos, a la angiogénesis y tratamiento tumoral. De manera más particular proporciona anticuerpos humanos anti-VEGF que inhiben de manera específica la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores de VEGF. Estos anticuerpos se diseñan para inhibir la angiogénesis y para inducir la regresión tumoral, y tienen aún seguridad mejorada debido a sus propiedades bloqueadoras específicas. Las composiciones basadas en anticuerpo y los métodos de la invención también se extienden al uso de inmunoconjugados y otras combinaciones terapéuticas, kits y métodos.

## Antecedentes de la Invención

La resistencia de células tumorales a los agentes quimioterapéuticos representa un problema significativo en la oncología clínica. En realidad, esta es una de las rezones principales por los cual muchas de las formas más prevalentes de cáncer humano resisten aún intervención quimioterapéutica efectiva, a pesar de ciertos avances en este campo.

Otra estrategia de tratamiento tumoral es el uso de una "inmunotoxina", en la cual se usa un anticuerpo anti-célula tumoral para administrar una toxina a las células tumorales. Son embargo, en común con los planteamientos quimioterapéuticos, la terapia de inmunotoxina también padece de desventajas significativas cuando se aplica a tumores sólidos. Por ejemplo, las

células negativa al antígeno o deficiente del antígeno pueden sobrevivir y repoblar el tumor o conducir a metástasis adicional.

Una razón adicional para la resistencia de tumores sólidos a terapias basadas en anticuerpo es que la masa tumoral en general es impermeable a agentes macromoleculares tal como anticuerpos e inmunotoxinas (Burrows et al, 1992; Dvorak et al, 1991a; Baxter y Jain, 1991). Tanto las distancias de difusión física como la presión intersticial dentro del tumor son limitaciones significativas a este tipo de terapia. Por lo tanto, los tumores sólidos, que pueden constituir más de 90 % de todos los cánceres humanos, han probado hasta ahora ser resistentes al tratamiento con anticuerpos e inmunotoxinas.

Una estrategia más reciente ha sido seleccionar como objetivo la vasculatura de tumores sólidos. La selección como objetivo de los vasos sanguíneos de los tumores en lugar de las células tumorales mismas, tiene ciertas ventajas ya que probablemente no va a conducir al desarrollo de células tumorales resistentes, y ya que las células seleccionadas como objetivo están fácilmente accesibles. Además, la destrucción de los vasos sanguíneos conduce a amplificación del efecto anti-tumor, puesto que muchas células tumorales dependen de un vaso único para su oxígeno y nutrientes (Burrows y Thorpe; 1993; 1994). Las estrategias de ejemplo de selección de objetivos vasculares se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,855,866 y 5,965,132, que describen de manera particular la administración dirigida de agentes anti-celulares y

toxinas a marcadores de la vasculatura tumoral.

Otra versión efectiva del planteamiento de selección de objetivos vasculares es seleccionar como objetivo un factor de coagulación a un marcador expresado o adsorbido dentro de la vasculatura tumoral (Huang et al, 1997; patentes de los Estados Unidos Nos. 5,877,289, 6,004,555, y 6,093,399). La distribución de coagulantes, en lugar de toxinas, la vasculatura tumoral tiene las ventajas adicionales de inmunogenecidad reducida y aún menor riesgo de efectos secundarios tóxicos. Como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,877,289, un factor preferido de coagulación para el uso en estos "coaguligandos" específicos de tumor es una versión truncada de la proteína inductora de coagulación humana, Factor de Tejido (TF), el iniciador principal de la coagulación sanguínea.

Aunque la distribución específica de toxinas y factores de coagulación a vasos sanguíneos tumorales representa una ventaja significativa en el tratamiento tumoral, ciertas células tumorales periféricas pueden sobrevivir a la destrucción intratumoral provocada por estas terapias. Por lo tanto, las estrategias anti-angiogénicas serán de uso en combinación con los métodos de instrucción tumoral de las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,855,866 y 6,004,555.

Las estrategias del tratamiento anti-angiogénicas se basan en inhibir la proliferación de vasos nacientes, en general en la periferia de un tumor sólido. Estas terapias son particularmente efectivas en la reducción del riesgo de

micrometástasis y en la inhibición del crecimiento de un tumor sólido después de, o en unión con, más intervención convencional (tal como cirugía o quimioterapia).

La angiogénesis es el desarrollo de nueva vasculatura a partir de vasos sanguíneos preexistentes y/o de células madre endoteliales en circulación (Asahara et al., 1997; Springer et al, 1998; Folkman y Shing, 1992). La angiogénesis juego un papel vital en muchos procesos fisiológicos, tal como embriogénesis, curación de heridas y menstruación. La angiogénesis también es importante en ciertos eventos patológicos. Además de un papel en el crecimiento y metástasis de tumores sólidos, otras condiciones notables con un componente angiogénico son artritis, psoriasis y retinopatía diabética (Hanahan y Folkman, 1996; Fidler y Ellis, 1994).

La angiogénesis se regula en tejidos normales y malignos por el equilibrio de estímulos angiogénicos e inhibidores angiogénicos que se producen en el tejido objetivo y en sitios distantes (Fidler et al., 1998; McNamara et al., 1998). El factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular, VPF) es un estimulante primario de la angiogénesis. El VEGF es una citocina multifuncional que se induce por hipoxia y mutaciones oncogénicas y se puede producir por una amplia variedad de tejidos (Kerbel et al., 1998; Mazure et al., 1996).

El reconocimiento de VEGF como un estímulo primario de la angiogénesis en condiciones patológicas ha conducido a varios intentos para bloquear la actividad de

VEGF. Se han propuesto anticuerpos inhibitorios anti-receptor de VEGF, construcciones de receptor solubles, estrategias antisentido, aptámeros de ARN contra VEGF e inhibidores de tirosina-cinasa de receptor de VEGF (RTK) de bajo peso molecular para el uso en la interferencia con la señalización de VEGF (Siemeister et al, 1998). Después de la inhibición del crecimiento tumoral en ratones usando un anticuerpo murino, (Kim et al., 1993 ; Asano et al, 1998; Mesiano et al, 1998; Luo et al, 1998a; 1998b; Borgstrom et al., 1996; 1998), un anticuerpo humanizado anti-VEGF llamado Avastin (bevacizumab) (Presta et al., 1997) se ha probado para uso clínico (Hurwitz et al., 2004).

Se han reportado otros anticuerpos murinos que reconocen VEGF e inhiben funciona inducidas por VEGF. Estos incluyen el anticuerpo murino llamado 2C3, que tiene la ventaja de inhibir la unión de VEGF a solo uno de los dos receptores primarios de VEGF (Brekken et al., 2000). Al bloquear la unión de VEGF a VEGFR2, pero no a VEGFR1, el anticuerpo 2C3 murino tiene un perfil mejorado de seguridad, manteniendo los efectos benéficos mediados por VEGFR1 (Brekken et al, 2000; U.S. patentes de los Estados Unidos Nos. 6,342,219, 6,524,583, 6,342,221).

Sin embargo, los inventores han reconocido que la identificación de agentes adicionales que reconocen VEGF e inhiben la angiogénesis inducida por VEGF serían de beneficio al expandir el número de opciones terapéuticas. Por ejemplo, el anticuerpo 2C3 murino, aunque promisorio, tiene ciertas limitaciones. En particular, el anticuerpo 2C3 no se une a VEGF de ratón, que significa que no se

puede usar en estudios clínicos que usan tumores singeneicos de ratón. La traducción más efectiva de estudios clínicos al uso clínico de esta manera se beneficiaría del desarrollo de un nuevo anticuerpo que se una tanto a VEGF de ratón como de humano.

Además, los inventores han reconocido que el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de humanos que son mejor tolerados desde una perspectiva inmunológica, sería ventajoso. A este respecto, los anticuerpos humanos tienen en general al menos tres ventajas potenciales para el uso en terapia humana. Primero, el sistema inmunitario humano no debe reconocer el anticuerpo como extraño. Segundo, la vida media en la circulación humana será similar a los anticuerpos humanos que se presentan de manera natural, permitiendo que se den dosis más pequeñas y menos frecuentes. Tercero, debido a que la porción efectora es humana, interactuará mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano, por ejemplo, para destruir las células objetivo más eficientemente por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Sin embargo, aunque se reconocen en general anticuerpo humanos que presentan estas ventajas, se sabe que el desarrollo de anticuerpos humanos que tengan altas afinidades y propiedades funcionales apropiadas para ser los candidatos para terapia humana exitosa no es de ninguna manera directo. La técnica hasta ahora carece aún de agentes que inhiban angiogénesis inducida por VEGF para el

tratamiento seguro y efectivo de humanos y posee retos al desarrollo de estos agentes.

**Breve Descripción de la Invención**

La presente invención supera ciertas limitaciones de la técnica anterior al proporcionar nuevas composiciones terapéuticas y nuevos métodos para el uso en tratamiento anti-angiogénico y anti-tumor. La invención se basa en anticuerpos humanos que tienen la propiedad funcional de inhibir específicamente la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores primarios de VEGF, y tienen una afinidad para VEGF suficientemente alta para regímenes efectivos de tratamiento. Estos anticuerpos inhiben la angiogénesis y tratan tumores tan efectivamente como otros anticuerpos anti-VEGF, incluyendo aquellos ya probados para uso clínico, y tienen aún seguridad mejorada debido a sus propiedades bloqueadoras específicas. Las composiciones y métodos de la invención también se extienden al uso de inmunoconjugados y combinaciones, incluyendo profármacos, usando la categoría específica de anticuerpos proporcionados.

Una ventaja particular de la presente invención es que los anticuerpos humanos facilitan la inhibición de la unión de VEGF solo a VEGFR2, y no a VEGFR1. Esto contrasta con los anticuerpos principales de la técnica anterior, incluyendo A4.6.1 y la versión humanizada Avastin, que inhibe la unión de VEGF tanto VEGFR2 como VEGFR1. Puesto que VEGFR1 tiene papeles biológicos importantes no relacionados a la angiogénesis por ejemplo, la función de osteoclastos y condroclastos, la presente

capacidad para inhibir solo la angiogénesis mediada por VEGFR2 es una ventaja distinta. Esto se traduce en notables beneficios clínicos ya que no se afecta de manera adversa el metabolismo óseo, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres pediátricos. Los efectos dañinos de los macrófagos en el progreso y metástasis tumoral también se inhiben, puesto que esta población de macrófagos expresa VEGFR2, que se inhibe por los anticuerpos de la invención.

Una ventaja adicional es que, puesto que la unión de VEGF a VEGFR1 se mantiene en la presencia de los anticuerpos de la invención, se pueden usar para administrar de manera específica agentes terapéuticos anexos a la vasculatura tumoral en virtud de la unión a VEGF que se une a VEGFR1, que se favorece en la expresión en el endotelio tumoral. En el contexto de inmunoconjugados, por lo tanto, la presente invención proporciona agentes que tienen tanto propiedades anti-angiogénicas como destructivas de tumor dentro de la misma molécula.

Aún una ventaja adicional existe en la capacidad de las composiciones proporcionadas para neutralizar la señal de supervivencia de VEGF, que se medía a través de VEGFR2. Los anticuerpos desnudos y conjugados de la invención forman de esta manera combinaciones sinérgicas con otras terapias y/o agentes anexos particularmente aquellos métodos y agentes que fallan en lograr efectividades máximas *in vivo* debido a la capacidad de VEGF para contrarestar sus propiedades destructivas.

Las secuencias de aminoácidos y/o ADN de las

moléculas de anticuerpo de la invención que se unen a VEGF, sus dominios $V_H$ y $V_L$ incluyendo regiones determinantes de complementariedad (CDR), se exponen en las varias SEQ ID NOs. listadas en la presente.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende un dominio de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De manera alteARNtiva o además, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a VEGF comprende un dominio de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De manera alteARNtiva o además, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a VEGF comprende un dominio de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De manera alteARNtiva o adicionalmente, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a VEGF comprende un dominio de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De manera alteARNtiva o adicionalmente, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a VEGF comprende un dominio de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De manera alteARNtiva o adicionalmente, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a VEGF comprende un domino de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De esta manera, en ciertas modalidades, la invención proporciona

un anticuerpo que se une a VEGF que comprende uno o más dominios de CDR de cadena pesada, en donde el domino de CDR de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un dominio de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(b) un dominio de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(c) un dominio de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

La invención también proporciona, en ciertas modalidades, un anticuerpo que se une a VEGF que comprende uno o más dominios de CDR de cadena ligera, en donde el dominio de CDR de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un dominio de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(b) un dominio de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una

secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(c) un dominio de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo que se une a VEGF comprende tanto

(a) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y

(b) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

De manera más preferente, un dominio de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, también están presentes.

En una modalidad preferida, la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, la CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

y la CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes de manera individual o en combinación.

En aún otra modalidad preferida, están presentes de manera individual o en combinación la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, la CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y la CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes de manera individual o en combinación.

Vista de manera alteARNtiva, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende

un dominio de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Este anticuerpo comprende además de manera opcional

un dominio de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o comprende además

un dominio de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o

un domino de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Vista de manera alteARNtiva, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF, que comprende

un dominio de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Este anticuerpo comprende además de manera opcional

un domino de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o comprende además

un domino de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o

un dominio de CDR1 de cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Vista de manera alteARNtiva, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende

un dominio de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Este anticuerpo comprende además de manear opcional

un dominio de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o comprende además

un dominio de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Ciertos anticuerpos preferidos de la invención comprenden una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las anteriores SEQ

ID NOs.

Ciertos anticuerpos preferidos comprenden dos o más CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEQ ID Nos anteriores. Las moléculas de unión especialmente preferidas comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de los SEQ ID NOs anteriores (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas anteriormente, o secuencias sustancialmente homólogas a las mimas).

Otros ciertos anticuerpos preferidos comprenden dos o más de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NOs: 5, 6 ó 7, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de los SEQ ID Nos anteriores. Las moléculas de unión especialmente preferidas comprenden 3 de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NOs: 5, 6 y 7, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de los SEQ ID NOs anteriores (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas anteriormente o secuencias sustancialmente homólogas).

Ciertos anticuerpos, más especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10 o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas anteriormente o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NOs: 5, 6 ó 7, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas

secuencias (es decir, una de cada una de la CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas anteriormente o secuencias sustancialmente homólogas a la misma).

Ciertos anticuerpos especialmente preferidos comprenden

un dominio de CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 5,

un dominio de CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y

un dominio de CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 7,

o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente; y/o comprenden

un dominio de CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 8,

un dominio de CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 9, y

un dominio de CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 10,

o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En una modalidad adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena libera comprende:

(i) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En un aspecto preferido de esta modalidad, se seleccionan una o más de las de las CDR de región variable de cadena pesada a partir del grupo que consiste de:

(i) una CDR1 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un aspecto adicional preferido de esta modalidad, se seleccionan dos de las CDR de región variable de cadena pesada del grupo que consiste de:

(i) una CDR1 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un aspecto aún adicionalmente preferido de esta modalidad, tres de las CDR de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste de:

(i) una CDR1 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Ciertas modalidades preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a VEGF y que comprende:

un dominio VH que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NOs: 5, 6, ó 7, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de SEQ ID NOs: 5, 6, ó 7, y/o

un dominio VL que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10.

Los dominios VL especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 8, 9 y 10, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10, (es decir, una de cada una de CDR1, CDR2 y CDR3 o secuencias sustancialmente homólogas a estas).

Los dominios VH especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NOs: 5, 6, y 7, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de SEQ ID NOs: 5, 6, ó 7 (es decir, una de cada una de CDR1, CDR2 y CDR3 o secuencias sustancialmente homólogas a estas).

Las modalidades más especialmente preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a VEGF y que comprende:

un dominio VL que comprende 3 CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 8, 9 y 10, y

un dominio VH que comprende 3 CDR de cadena pesada. En modalidades preferidas, una, dos o tres de las CDR de cadena pesada son como se definen en SEQ ID NOs: 5, 6, y 7.

Ciertas modalidades preferidas de la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta.

Las modalidades adicionales preferidas proporcionan un anticuerpo que se une a VEGF que comprende un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio VH que comprende 3 CDR de cadena pesada. De manera preferente, el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En una modalidad aún adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (el anticuerpo que también se refiere en la presente como r84 o PGN311 o EJ173/112-C11), o que comprende un fragmento del mismo que se une a VEGF, o una secuencia sustancialmente homóloga a esta.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (el anticuerpo

que también se refiere en la presente como r84 o PGN311 o EJ173/112-C11), o que comprende un fragmento de la misma que se une a VEGF.

La invención se ejemplifica por el anticuerpo monoclonal r84 (también referido en la presente como PGN311 y EJ-173-112-C11), una forma de cadena individual del cual se muestra en la Figuras 1A-1B (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 20) y una forma de IgG de longitud completa de la cual se muestra en el Ejemplo 6. Los dominios de CDR, los dominios VH y VL del anticuerpo r84 se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1. Los anticuerpos que comprenden estos dominios de CDR o dominios VH y VL (o secuencias sustancialmente homólogas a estos) son aspectos preferidos de la invención.

Una modalidad preferida de la invención es una forma scFv del anticuerpo r84 mostrado en SEQ ID NO: 21 (aminoácidos), que se codifica preferentemente por SEQ ID NO: 20 (ácido nucleico).

Otra modalidad preferida de la invención es una forma IgG de longitud completa del anticuerpo r84, la cadena pesada de la cual se muestra en SEQ ID NO: 24 (aminoácidos), que se codifica preferentemente por SEQ ID NO: 22 (ácido nucleico); y la cadena ligera de la cual se muestra en SEQ ID NO: 25 (aminoácidos), que se codifica preferentemente por SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico).

Ciertos ejemplos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen al menos 70 % de identidad a las secuencias de aminoácidos descritas.

En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención que se unen a VEGF comprenden al menos una región

variable de cadena ligera que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % o 95 % y de manera más preferente al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y/o al menos una región variable de cadena pesada que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, de manera más preferente de al menos aproximadamente 80 %, de manera más preferente al menos aproximadamente 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % o 95 % y manera más preferente al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Otros ejemplos preferidos se secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos, descritas.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen 1, 2 ó 3, preferentemente 1 ó 2, aminoácidos alterados en una o más de las regiones CDR descritas. Estas alteraciones pueden ser sustituciones conservadas o no conservadas de aminoácidos, o una mezcla de las mismas.

En todas estas modalidades, las alteraciones preferidas son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

En todas las modalidades, los anticuerpos que

contienen secuencias sustancialmente homólogas retienen la capacidad para unirse a VEGF.

En las modalidades de la invención donde se contemplan las alteraciones en el dominio de CDR3 de cadena ligera, se prefiere que el residuo L en la posición 8 en la CDR se retenga sin variaciones.

Otras modalidades de la presente invención proporcionan proteínas de unión que se unen a VEGF y que comprenden un anticuerpo de la invención, un dominio VH o VL de la invención, o una o más de las CDR de la invención. En una modalidad preferida, estas proteínas de unión son anticuerpo.

Los anticuerpos preferidos de la invención comprenden al menos una región variable de cadena pesada que comprende CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR. Se describen en la presente secuencias de ejemplo y preferidas para estas CDR.

Como se usa en presente el término abreviado "VEGF", a menos que se señale específicamente de otro modo o se haga claro de la terminología científica, significa Factor-A de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF-A), también conocido como factor de permeabilidad vascular, VPF.

El "VEGF" también significa cualquier forma de VEGF, particularmente puesto que VEGF está conservado a través de las especies mamíferas. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención de esta manera se pueden unir a VEGF humano, de mono, de vaca (bovino), de ratón, de rata, de hámster, de hurón, de cobayo y/o de

conejo, a manera de ejemplo. De manera preferente, los anticuerpos o fragmentos de la invención se unirán a al menos VEGF humano. En ciertas modalidades preferidas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unir a al menos VEGF humano o de ratón.

Como se usa en la presente, el término "que se une a VEGF" en el contexto de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención, significa anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo que son capaces de uno o más de lo siguiente; preferentemente, de más de uno de lo siguiente; y de manera más preferente, de todo lo siguiente: (a) unirse a un epítopo de VEGF no conformacionalmente dependiente, como se valora por la unión a VEGF en una transferencia Western;

(b) unirse a VEGF libre o a VEGF en un soporte sólido;

(c) unirse a al menos VEGF humano y VEGF de ratón;

(d) inhibir de manera significativa o reducir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1);

(e) no inhibir de manera significativa VEGF ni reducir la unión al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1);

(f) inhibir, y preferentemente, inhibir de manera significativa, la fosforilación inducida por VEGF del VEGFR2;

(g) inhibir, y preferentemente, inhibir de manera significativa, la permeabilidad vascular inducida por VEGF;

(h) inhibir, y de manera preferente, inhibir de

manera significativa, la proliferación de células endoteliales mediada por VEGF;

(i) inhibir, y de manera preferente, inhibir de manera significativa, la angiogénesis;

(j) inhibir, y de manera preferente, inhibir de manera significativa, la linfangiogénesis;

(k) no inhibir de manera significativa la estimulación mediada por VEGFR1 o la estimulación de células, tal como osteoclastos o condroclastos que expresan VEGFR1; y/o

(l) localizar la vasculatura tumoral y/o estroma tumoral en administración a un animal con un tumor vascularizado.

De menara más preferente, el anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo de la invención es uno que inhibe de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1).

La presente invención proporciona por lo tanto anticuerpos humanos que bloquean de manera específica la unión de VEGF al receptor VEGFR2, o que bloquean la unión de VEGF a solo esencialmente el receptor VEGFR2. Estos anticuerpos humanos inhiben de manera significativa la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (F1t-1). Estos anticuerpos humanos inhiben de este modo la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/F1k-1), no inhiben de manera sustancial la unión de VEGF al receptor de VEGFR1 (F1t-1), exhiben efectos anti-angiogénicos y anti-tumorales

*in vivo* y no inhiben de manera significativa los eventos mediados por VEGFR1, tal como las funciones de los osteoclastos o condroclastos.

Los anticuerpos humanos de la invención se llaman de esta manera de formas abreviadas "anticuerpos humanos anti-VEGFR2, que no bloquean VEGFR1, y bloquean VEGFR2". De manera aún más abreviada, se llaman "anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2", que se usa por simplicidad con referencia a todas las composiciones, usos y métodos de la invención. Un "anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2" es un anticuerpo humano contra VEGF que bloquea la unión de VEGF a su receptor VEGFR2. Será claro que estos anticuerpos no son anticuerpos contra el receptor VEGFR2 mismos.

En vista de esta invención, por lo tanto, se pueden producir una variedad de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 y usar en una variedad de modalidades, incluyendo en la inhibición de angiogénesis y en el tratamiento de enfermedades angiogénicas y tumores sin inhibir la señalización de VEGF mediante el receptor VEGFR1 y sin las desventajas notables y los efectos secundarios asociados con esto.

En ciertas modalidades, la presente solicitud describe adicionalmente metodología para generar anticuerpos humanos candidatos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 y los aspectos técnicos de rutina de los ensayos requeridos para identificar anticuerpos reales específicos bloqueadores de VEGFR2 de la mezcla de candidatos.

Como se usa a todo lo largo de la solicitud

completa, los términos "un" y "una" se usan en el sentido que significan "al menos uno", "al menos un primero", "uno o más" o "una pluralidad" de los componentes o pasos referidos, excepto en casos donde se señale más adelante de manera específica un límite superior. Por lo tanto, un "anticuerpo", como se usa en la presente, significa "al menos un primer anticuerpo". Los límites y parámetros operables de combinaciones, como con las cantidades de cualquier agente individual, se conocerán por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

Los anticuerpos humanos de la invención "inhiben de manera específica la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1)" se pueden identificar por ensayos de competición y/o funcionales. Los ensayos funcionales, por simplicidad, son ensayos de competición basados en ELISA. En ensayos de competición, uno pre-mezcla o mezcla VEGF con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, exceso molar de 100 veces a 1000 veces, por ejemplo, exceso molar de 500 veces a 750 veces) y determinan la cantidad de los anticuerpos de prueba para reducir la unión de VEGF a VEGFR2. El VEGF se puede pre-marcar y detectar de manera directa, o se puede detectar usando un anticuerpo (secundario) anti-VEGF o un sistema de detección de anticuerpo secundarios y terciarios. Un formato de ELISA de este ensayo de competición es una forma preferida, pero se puede llevar a cabo cualquier tipo de ensayo de inmunocompetición.

La unión de VEGF al VEGFR2 en la presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (incluyendo

anticuerpos monoclonales no bloqueadores anti-VEGF) es el alto valor de control (100 %) en este ensayo de competición. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de VEGF al VEGFR2 en la presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de un anticuerpo de prueba que inhibe de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1).

Una reducción significativa es una reducción "reproducible", es decir, observada de manera consistente en la unión. Una "reducción significativa" en términos de la presente solicitud se define como una reducción reproducible (en la unión de VEGF al VEGFR2) de al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 % o aproximadamente 65 % en cualquiera cantidad entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces (por ejemplo, aproximadamente 500 veces o aproximadamente 750 veces) de exceso molar del anticuerpo sobre VEGF. Visto de manera alterativa, una señal de menos de 50 % (cuando se compara a un valor de control de 100 %) se considera inhibición significativa de la unión.

Una característica preferida de la invención es que los anticuerpos humanos proporcionados no inhiben, reducen ni bloquean de manera sustancial o significativa la unión de VEGF a VEGFR1. Los anticuerpos humanos que exhiben una reducción moderadamente significativa de la unión de VEGF al VEGFR2 serán aún útiles en tanto que no inhiban de manera sustancial la unión de VEGF al VEGFR1. Sin embargo, los anticuerpos más preferidos serán aquellos que tengan una capacidad más significativa para inhibir la unión de

VEGF a VEGFR2. Estos anticuerpos son aquellos que exhiben una capacidad reproducible para reducir la unión de VEGF al VEGFR2 por al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 % o aproximadamente 80 % en cualquier cantidad entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces (por ejemplo, aproximadamente 500 veces o aproximadamente 750 veces) de exceso molar de anticuerpo sobre VEGF. Aunque no se requiere para practicar la invención, los anticuerpos que reducen la unión de VEGF al VEGFR2 por al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aún mayor de ninguna manera se excluyen.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que inhiben la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1) se confirman fácilmente por ensayos simples de competición tal como aquellos descritos anteriormente, pero usando VEGFR1.

La ausencia de una inhibición o reducción significativa es un "mantenimiento sustancial de unión" "reproducible", es decir, que se observa de manera consiste. Un "mantenimiento sustancial de unión" en términos de la presente solicitud se define como un mantenimiento reproducible (en la unión de VEGF a VEGFR1) de al menos aproximadamente 60 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 % o aproximadamente 85 % a cualquier cantidad de entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces de exceso molar del anticuerpo sobre VEGF.

La intensión de usar anticuerpos humanos que no inhiban de manera sustancial la unión de VEGF al VEGFR1 es mantener las funciones biológicas mediadas por VEGFR1. Por lo tanto, un anticuerpo solo necesita mantener suficiente unión de VEGF al VEGFR1 de modo que se induzca una respuesta biológica por VEGF. Sin embargo, los anticuerpos más preferidos serán aquellos que tengan una capacidad más significativa para mantener la unión de VEGF al VEGFR1. Estos anticuerpos son aquellos que exhiben una capacidad reproducible para mantener la unión de VEGF al VEGFR1 a niveles de al menos aproximadamente 88 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 95 % o de aproximadamente 98-99 % en cualquier cantidad entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces de exceso molar del anticuerpo sobre VEGF.

Se entenderá que los anticuerpos humanos que inhiben de manera más sustancial la unión de VEGF al VEGFR2 pueden tolerar probablemente más reducción en la unión a VEGFR1. Igualmente, donde un anticuerpo tiene una reducción moderada en la unión de VEGF al VEGFR2, se debe seguir más estrictamente el mantenimiento de la unión a VEGFR1.

Otro ensayo preferido de unión para identificar y/o confirmar que un anticuerpo inhibe la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) es un ensayo de co-precipitación. Un ensayo de co-precipitación prueba la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de VEGF a uno o más receptores en solución. En este ensayo, el VEGF o VEGF marcado de manera detectable se incuba con una forma adecuada del receptor.

Hay muchos formatos para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación y co-precipitación. En el presente caso, una "forma adecuada del receptor" puede ser el receptor VEGFR2 en cuestión o el dominio extracelular del receptor. La inmunoprecipitación entonces requerirá, así como los reactivos normales, la presencia de un anticuerpo contra el receptor VEGFR2 o un epítopo en el dominio extracelular del receptor distinto del sitio al cual se une VEGF. La presente invención proporciona otras formas "adecuadas" de los receptores de VEGF, específicamente los dominios extracelulares de los receptores enlazados a una porción de anticuerpo Fc. Estas construcciones de receptor/Fc se pueden precipitar por incubación por una composición inmunoprecipitadora efectiva, tal como una composición basada en Proteína A.

Independientemente del receptor adecuado, los ensayos de inmunoprecipitación o de co-precipitación se llevan a cabo preferentemente con controles. La capacidad de VEGF solo para unirse el receptor elegido se debe confirmar por la precipitación en la ausencia de un anticuerpo anti-VEGF. De manera preferente se lleva a cabo incubaciones paralelas en la presente o ausencia de un anticuerpo con propiedades conocidas de unión para actuar como un control. De menara más preferente, corren en paralelo ensayos que usan tanto un anticuerpo bloqueador de control como un anticuerpo no bloqueador de control.

Entonces se inmunoprecipitan cualesquiera de las especies inmunológicas unidas, por ejemplo, por incubación con una composición inmunoprecipitadora efectiva, tal como

una composición de Proteína A o perlas de Proteína A-sefarosa. El precipitado entonces se prueba para la presencia de VEGF. Donde el VEGF en la incubación inicial fue VEGF marcado de manera detectable, tal como VEGF radiomarcado, se puede detectar directamente cualquier VEGF en los inmunoprecipitados. Cualquier VEGF no marcado en los inmunoprecipitados se puede detectar por otros medios adecuados, por ejemplo, por separación en gel e inmunodetección con un anticuerpo anti-VEGF.

La capacidad de un anticuerpo humano para bloquear la unión de VEGF a un receptor de VEGF, tal como VEGFR2, en este ensayo de co-precipitación se puede cuantificar fácilmente aunque también son valiosos los resultados cualitativos. Se puede lograr la cuantificación por medición directa del VEGF marcado o por ejemplo, por análisis densitométricos del VEGF inmunodetectado. Los anticuerpos que exhiben una capacidad reproducible, es decir, que se observa de manera consistente, para inhibir la unión de VEGF a VEGFR2 de esta manera se pueden detectar, y se pueden elegir los anticuerpos útiles de acuerdo a los criterios cuantitativos resumidos anteriormente.

Las anticuerpos humanos anti-VEGF que no inhiben de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1) se pueden identificar también fácilmente al llevar a cabo ensayos de co-precipitación como se describe anteriormente, pero usando VEGFR1 en lugar de VEGFR2. Por lo tanto, los anticuerpos anti-VEGF que inhiben la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2

(KDR/F1k-1) sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1) también se puede identificar fácilmente usando estos métodos.

La presente solicitud también proporciona varios ensayos funcionales para identificar y/o confirmar que un anticuerpo humano inhibe de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1). Estos se refieren en general a la identificación de VEGFR2 como el receptor responsable de ciertas respuestas biológicas definidas. Aunque los ensayos anteriores tipo competición, que se llevan a cabo en sistemas libres de células, son más reproducibles, confiables, ahorradores de labor y redituables, también son útiles los siguientes ensayos en el contexto de la presente invención.

Por ejemplo, se puede identificar un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 al probar la capacidad para inhibir el crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF (que inhibe la actividad mitogénica de VEGF). Se puede emplear cualquier ensayo adecuado usando cualquiera de una variedad de células endoteliales en la presencia de VEGF con o sin anticuerpos de prueba. De manera preferente, se corren en paralelo ensayos duplicados, tal como aquellos sin VEGF y aquellos con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueadores como no bloqueadores). El crecimiento de células endoteliales se puede determinar y cuantificar preferentemente de manera exacta por cualquier medio aceptable de determinación del número de células, incluyendo ensayos colorimétricos.

Un anticuerpo humano con la capacidad para inhibir el crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF exhibirá en general una inhibición consistentemente observada del crecimiento de células endoteliales mediado por VEGF de aproximadamente 25 %, 30 %, 35 %, 40 % 45 % o 50 % y así sucesivamente. La inhibición en estos intervalos indicará un anticuerpo con propiedades suficientes para inhibir la angiogénesis *in vivo*. Los anticuerpos con actividad inhibitoria más significativa se excluyen de la invención.

Los ensayos funcionales adicionales para identificar anticuerpos humanos de acuerdo con la presente invención son ensayos para probar el bloqueo de la fosforilación inducida por VEGF. Se puede emplear cualquier ensayo adecuado usando cualquier de una variedad de células endoteliales que expresan cualquiera forma de VEGFR2 fosforilable, nativo o recombinante. Se incuban células con VEGF en la presencia o ausencia del anticuerpo que se va a probar durante un período adecuado de tiempo. De manera preferente, se corren en paralelo ensayos duplicados, tal como aquellos sin VEGF y aquellos con anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueadores como no bloqueadores).

Se puede determinar la fosforilación inducida por VEGF del VEGFR2 y se cuantifica de manera preferentemente exacta por cualquier medio aceptable. En general, el VEGFR2 se inmunoprecipita para análisis adicional. Se puede determinar directamente el grado de fosforilación de VEGFR2, por ejemplo, las células pueden haber sido

incubadas con ATP marcada con $^{32}P$, que permite la cuantificación directa del $^{32}P$ dentro del VEGFR2 inmunoprecipitado. De manera preferente, el VEGFR2 inmunoprecipitado se analiza por otro medio, por ejemplo, por separación en gel e inmunodetección con un anticuerpo que se une a los residuos de fosfotirosina. Un anticuerpo humano con la capacidad para inhibir la fosforilación de VEGF2, inducida por VEGFR, exhibirá en general una reducción consistentemente observada en los niveles de VEGFR2 fosforilado.

Los ensayos funcionales aún adicionales para identificar anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, de acuerdo con la presente invención, son ensayos para probar la inhibición de la permeabilidad vascular inducida por VEGF. Aunque se pueden usar cualquiera de estos ensayos, un ensayo particularmente adecuado es el ensayo de permeabilidad de Miles, en donde animales tal como cobayos se inyectan con un tinte, tal como tinte azul de Evan, y se determina la aparición del tinte en la piel del animal después de la provisión de VEGF en la presencia o ausencia de los anticuerpos de prueba. De manera preferente, se llevan a cabo en paralelo estudios duplicados tal como aquellos sin VEGF y aquellos de anticuerpos de control de propiedades definidas (tanto bloqueadores como no bloqueadores). La aparición del tinte en la piel del animal es típicamente como puntos, tal como puntos azules, en la espalda del animal, que se pueden fotografiar y medir.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de

VEGFR2 inhibirán la permeabilidad vascular inducida por VEGF como una inhibición observada de manera consistente a bajas concentraciones, tal como cuando se proporciona un exceso molar de 100 veces, o 1000 veces sobre VEGF. Los anticuerpos que no bloquean la inhibición de VEGF al VEGFR2 no mostrarán ninguna inhibición significativa de la permeabilidad vascular inducida por VEGF. En general, los anticuerpos que bloquean la permeabilidad inducida por VEGF solo a altas concentraciones, tal como a un exceso molar de 10 veces sobre VEGF, no serán anticuerpos con propiedades de acuerdo con la presente invención.

Los ensayos funcionales ampliamente aceptados de angiogénesis, y por lo tanto, agentes, anti-angiogénicos, son el ensayo de microconcavidad corneal de neovascularización y el ensayo de membrana corio-alantoica de pollo (CAM). La patente de los Estados Unidos No. 5,712,291 se incorpora específicamente en la presente como referencia para mostrar que los ensayos de microconcavidad corneal y de CAM son suficientemente predictivos para identificar agentes para el uso en el tratamiento de una variedad extremadamente amplia de enfermedades angiogénicas.

La patente de los Estados Unidos No. 5,001,116 también se incorpora específicamente en la presente como referencia para los propósitos de describir el ensayo de CAM. Esencialmente, se removieron embriones fertilizados de pollo de su cáscara en el día 3 ó 4, y se implanta en la membrana corioalantoica un disco de metilcelulosa que contiene el compuesto de prueba. Los embriones se examinan

aproximadamente 48 horas después y se aparece una zona clara sin vasos sanguíneos alrededor del disco de metilcelulosa, se mide el diámetro de esa zona. Como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,712,291, incorporada específicamente en la presente por referencia para este propósito, en el contexto de la presente invención, la aparición de cualquier zona sin vasos sanguíneos es suficiente para evidenciar un anticuerpo anti-angiogénico. Entre mayor sea la zona, más efectivo es el anticuerpo.

El ensayo de microconcavidad corneal de la neovascularización se puede practicar usando córneas de rata y conejo. Este modelo *in vivo* está ampliamente aceptado puesto que es predictivo de la utilidad clínica, como se evidencia por las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,712,291 y 5,871,723, cada una incorporada específicamente en la presente como referencia para propósitos de evidencia. Aunque no se crea que sea particularmente pertinente a la presente invención. Los ensayos corneales son preferibles con respecto al ensayo de CAM debido a que reconocerán en general compuestos que son inactivos *per se* pero se metabolizan para producir compuestos activos.

En la presente invención, el ensayo de microconcavidad corneal se usa para identificar un agente anti-angiogénico. Esto se evidencia por una reducción significativa en la angiogénesis, como se representa por una reducción consistentemente observada y preferentemente marcada del número de vasos sanguíneos dentro de la córnea.

Estas respuestas se definen preferentemente como aquellas córneas que muestran solo un brote ocasional y/o una asa de horquilla que no presentó evidencia de crecimiento sostenido cuando se puso en contactos con la sustancia de prueba.

La invención como se reivindica se permite de acuerdo con la presente especificación y las referencias tecnológicas fácilmente disponibles, el conocimiento y materiales de inicio.

Ciertas modalidades preferidas de la invención por lo tanto son composiciones que comprenden al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que inhiben de manera específica la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1); y anticuerpos anti-VEGF, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que inhiben la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/F1k-1) sin que inhiban de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (F1t-1) forman otros aspectos de la invención.

Se pueden identificar fácilmente anticuerpos humanos con las combinaciones deseadas de propiedades por uno o más o una combinación de ensayos de competición de receptores, de ELISA, de co-precipitación, y/o funcionales, descritos anteriormente. La guía con respecto a la valoración cuantitativa de los anticuerpos que reducen de manera consistentemente significativa la unión de VEGF al VEGFR2 y que no inhiben de manera consistente la unión de

VEGF al VEGFR1 es como se describe anteriormente.

Se muestra en la presente que r84 reduce la cantidad de VEGF que se une a las concavidades de ELISA revestidas con VEGFR2 a aproximadamente 11 % y 2 %, respectivamente, a excesos molare de 100 veces y 500 veces sobre VEGF. Estas cifras son iguales a las reducciones en la unión de VEGF al VEGFR2 de aproximadamente 89 % y aproximadamente 98 %, respectivamente. Se muestra en la presente que r84 mantiene la cantidad de VEGF que se une a concavidades de ELISA revestidas con VEGFR1 a aproximadamente 94 % y 84 %, respectivamente, a excesos molares de 100 veces y 500 sobre VEGF. Aún a un exceso molar de 1000 veces sobre VEGF, el r84 mantiene aún la unión de VEGF a VEGFR1 a aproximadamente 65 %. Nuevamente se entenderá que los anticuerpos que inhiben de manera más sustancial la unión de VEGF al VEGFR2 pueden tolerar probablemente más reducción en la unión a VEGFR1. Igualmente, donde un anticuerpo tiene una reducción moderada en la unión de VEGF al VEGFR2, se debe perseguir más estrictamente el mantenimiento de la unión a VEGFR1. De esta manera, se apreciará que una diferencia "comparativa" entre los dos valores es importante.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para los anticuerpos humanos de la presente invención como se define en la presente o partes o fragmentos de los mismos, o moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas a las mismas, forman aspectos aún adicionales de la invención. Las moléculas preferidas de ácido nucleico comprenden

secuencias que codifican para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (que se codifica preferentemente por SEQ ID NO: 20). Otras moléculas preferidas de ácido nucleico comprenden secuencias que codifican para una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (que se codifica preferentemente por SEQ ID NO: 22) y que codifica para una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (que se codifica preferentemente por SEQ ID NO: 23).

Otras moléculas preferidas de ácido nucleico comprenden secuencias que codifican para las formas de IgG de los anticuerpos de la invención o formas quiméricas murinas, por ejemplo, aquellas como se describe en el Ejemplo 6.

Como se indica anteriormente, otras moléculas de ácido nucleico abarcadas por la presente invención son aquellas que codifican para partes o fragmentos de los anticuerpos humanos de la presente invención, por ejemplo, aquellas que codifican para una cadena pesada de un anticuerpo (por ejemplo, aquellas que codifican para SEQ ID NO: 24, tal como SEQ ID NO: 22) o aquellas que codifican para una cadena ligera de un anticuerpo (por ejemplo, aquellas que codifican para SEQ ID NO: 25, tal como SEQ ID NO: 23). Otras moléculas preferidas de ácido nucleico son aquellas que codifican para una región VH de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, aquellas que codifican para SEQ ID NO: 3, tal como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 26). Otras moléculas preferidas de ácido nucleico son aquellas que codifican para una región VL de un anticuerpo

de la presente invención (por ejemplo, aquellas que codifican para SEQ ID NO: 4, tal como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 27).

De esta manera, los fragmentos de los anticuerpos de la invención como se define en la presente, o secuencias sustancialmente homólogas a los mismos, o moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias que codifican para estos fragmentos forman un aspecto aún adicional de la invención.

De manera ventajosa, los anticuerpos de la presente invención, cuando están en el formato IgG, tienen una alta afinidad de unión para VEGF, es decir, tiene una Kd en el intervalo de 1 x $10^{-8}$ M o menos. De manera importante, los anticuerpos con esta afinidad están en el intervalo establecido que se ha mostrado que es útil para terapia. De manera preferente, los anticuerpos de la invención, cuando están en el formato de IgG, tienen una afinidad de unión para VEGF (preferentemente VEGF humano) que corresponde a una Kd de menos de 20 nM, 15 nM o 10 nM, de manera más preferente menos de 10, 9.5, 9, 8.5, 8, 7.5, 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 ó 1 nM. Por ejemplo, la afinidad de unión de los anticuerpos de la invención, cuando están en el formato de IgG, puede ser 6.7 x $10^{-9}$ M o menos, tal como que es aproximadamente 7 x $10^{-9}$ M o aproximadamente 6 x $10^{-9}$ M o como que es 6.7 x $10^{-9}$ M. Se puede usar cualquier método apropiado para determinar Kd. Sin embargo, de manera preferente la Kd se determina al probar varias concentraciones del anticuerpo de prueba contra varias concentraciones del antígeno (VEGF) *in vitro*

para establecer una curva de saturación, por ejemplo usando el método de Lineweaver-Burk, o de manera preferente, al usar un software comercialmente disponible de modelo de unión, tal como el modelo de unión 1:1 en el software de Evaluación Biacore 3000. En el Ejemplo 5 para propósitos ilustrativos se describe un ensayo adecuado. De manera preferente, la Kd se determinar al inmovilizar el antígeno (VEGF) en un soporte sólido, por ejemplo, un chip Biacore, y al valorar la unión del anticuerpo al antígeno. De manera preferente, la afinidad de unión se valora a temperatura ambiente, por ejemplo, a una temperatura de 25°C, aunque también se puede valorar a otras temperaturas, por ejemplo, 37°C (por ejemplo, temperatura corporal).

Como se analiza en otra parte de la presente, los anticuerpos preferidos de la invención se unen tanto a VEGF humano como VEGF murino. Ésta es una ventaja importante para permitir la traducción más efectiva desde estudios preclínicos al uso clínico. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse tanto a VEGF humano como VEGF murino significa que estos anticuerpos se pueden probar en estudios preclínicos usando modelos tumorales tanto singenéicos como de xenoinjerto. Los anticuerpos que no se unen a VEGF de ratón no se pueden usar en modelos singenéicos de ratón.

Además, la capacidad para unirse tanto a VEGF de humano como de ratón significa que los resultados mostrados por estos anticuerpos de la invención en los modelos de xenoinjerto de ratón van a ser más probablemente representativos de la actividad de los anticuerpos en

sujetos humanos. La razón para esto es que los anticuerpos que pueden unirse a VEGF humano pero no a VEGF de ratón (por ejemplo, Avastin y 2C3) se unirán a VEGF producido por las células tumorales humanas en el modelo de ratón pero no serán capaces de unirse a VEGF murino endógeno. Por supuesto, esto es diferente de la situación en un paciente humano, en el cual estarán presente el VEGF producido por el tumor como el VEGF endógeno.

La desventaja potencial con esta situación es que un anticuerpo que se una a VEGF humano pero no a VEGF de ratón puede desempeñarse bien en un modelo de xenoinjerto de ratón pero esto no se puede reflejar por un desempeño similar en un sistema humano donde está presente mucho más VEGF. En otras palabras, el efecto anti-tumoral visto en un sistema de xenoinjerto de ratón con un anticuerpo que puede unirse a VEGF humano pero no a VEGF de ratón puede verse mejor que la realidad clínica. En contraste, si se está trabajando con un anticuerpo que puede unirse tanto a VEGF humano como de ratón entonces esto se unirá a todas las formas de VEGF presentes en el sistema de modelo de ratón y es probable que sea más representativo de la situación cuando el anticuerpo se pone en humanos.

En las siguientes descripciones de las composiciones, inmunoconjugados, productos farmacéuticos, combinaciones, cocteles, kits, primeros y segundos usos médicos y todos los métodos de acuerdo con esta invención, los términos "anticuerpo" e "inmunoconjugado", o una región de unión a antígeno o fragmento de los mismos, a menos que se señale específicamente lo contrario o se haga claro de

la terminología científica, se refiere a una variedad de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 así como a los anticuerpos r84 específicos.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina", como se usan en la presente, se refieren ampliamente a cualquier agente o molécula de unión inmunológica que comprende un dominio humano de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, se asignan anticuerpos enteros a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de éstas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman $\alpha$, $\delta$, $\varepsilon$, $\gamma$ y $\mu$, respectivamente. También se conocen las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

En general, donde en la invención se usen anticuerpos enteros en lugar de regiones de unión a antígeno, se prefieren IgG y/o IgM debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se producen más fácilmente en un escenario de laboratorio.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos mamíferos se asignan a uno de dos tipos claramente distintos: kappa ($\kappa$) y lambda ($\lambda$), con base en las secuencias de aminoácidos de esos dominios constantes y algunos aminoácidos en las regiones menos variables de sus

dominios variables. Esencialmente no hay preferencia al uso de las regiones constantes de cadena ligera κ o λ en los anticuerpos de la presente invención.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, los reactivos de unión inmunológica abarcados por el término "anticuerpo" se extienden a todos los anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos enteros, anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y creados por ingeniería, y fragmentos de los mismos.

El término "anticuerpo" se usa de esta manera para referirse a cualquier molécula humana tipo anticuerpo que tenga una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab', Fab, $F(ab')_2$, anticuerpos de dominio único (DAB), dímero de TandAb, Fv, scFv (Fv de cadena individual), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos biespecíficos de anticuerpo y similares.

Las técnicas para preparar y usar varias construcciones y fragmentos basados en anticuerpo son bien conocidas (ver Kabat et al., 1991, específicamente incorporado en la presente como referencia). Los diacuerpos, en particular, se describen adicionalmente en EP 404, 097 y WO 93/11161; en tanto que los anticuerpos lineales se describen adicionalmente en Zapata et al. (1995).

Usando técnicas convencionales se pueden

fragmentar los anticuerpos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos $F(ab')_2$ al tratar el anticuerpo con pepsina. El fragmento $F(ab')_2$ resultante se puede tratar para reducir puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y $F(ab')_2$, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TadAbs, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos biespecíficos de anticuerpo y otros fragmentos también se pueden sintetizar por técnicas recombinantes o se pueden sintetizar de manera química. Son bien conocidas y se han descrito técnicas para producir fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, cada uno de Beckman et al., 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall et al., 2004; Reff & Heard, 2001; Reiter et al., 1996; y Young et al., 1995 describe adicionalmente y permite la producción de fragmentos efectivos de anticuerpo.

Los anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo se pueden producir de manera natural o pueden ser producidos completa o parcialmente de forma sintética. De esta manera, el anticuerpo puede ser de cualquier fuente apropiada, por ejemplo, fuentes recombinantes y/o producido en animales transgénicos o plantes transgénicas, o en huevos usando tecnología de IgY. De esta manera, las moléculas de anticuerpo se pueden producir *in vitro* o *in vivo*.

De manera preferente, el anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo comprende una región variable ($V_L$) de cadena ligera de anticuerpo que comprende tres dominios de CDR y una región variable ($V_H$) de cadena pesada de

anticuerpo que comprende tres dominios de CDR. Estas VL y VH forman en general el sitio de unión a antígeno.

Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región tiene un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente estrecha. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero de $V_H$-$V_L$. De manera colectiva, las seis regiones hipervariables (CDR) confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

Sin embargo, está bien documentado en la técnica que la presencia de tres CDR del dominio variable de cadena ligera y tres CDR del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo no es necesaria para la unión al antígeno. De esta manera, se conoce que son efectivas construcciones más pequeñas que el fragmento clásico anterior de anticuerpo.

Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos (Hamers-Casterman et al., 1993; Arbabi Chahroudi et al., 1997) tienen un extenso repertorio de unión a antígeno pero están desprovistos de cadenas ligeras. También, los resultados con anticuerpos de dominio único que comprenden dominios VH (Ward et al., 1989; Davies y Riechmann, 1995) o los dominios VL solos (van den Beucken et al., 2001) muestran que estos dominios pueden unirse al antígeno con afinidades aceptablemente altas. De esta manera, tres CDR pueden unirse de manera efectiva al antígeno.

También se sabe que una CDR individual, o dos CDR, pueden unirse de manera efectiva al antígeno. Como un primer ejemplo, se puede insertar una CDR individual en una proteína heteróloga y conferir capacidad de unión a antígeno en la proteína heteróloga, como se ejemplifica al mostrar que la región CDR3 VH insertada en una proteína heteróloga, tal como GFP, contiene capacidad de unión a antígeno en la proteína heteróloga (Kiss et al., 2006; Nicaise et al., 2004).

Además, se sabe que dos CDR pueden unirse de manera efectiva al antígeno, y conferir aún propiedades superiores que se poseen por el anticuerpo de origen. Por ejemplo, se ha mostrado (Qiu et al., 2007) que dos CDR de un anticuerpo de origen (una región CDR1 VH y CDR3 VL) retiene las propiedades de reconocimiento de antígeno de la molécula de origen pero tiene una capacidad superior para penetrar tumores. La unión de estos dominios con una secuencia ligadora apropiada (por ejemplo, de FR2 VH) para orientar las CDR de una manera que asemeje el anticuerpo nativo de origen, produjo aún mejor reconocimiento de antígeno. Por lo tanto, se sabe en la técnica que es posible construir miméticos de anticuerpo de unión a antígeno que comprenden dos dominios de CDR (preferentemente uno de un dominio VH y uno de un dominio VL, de manera más preferente, con uno de los dos dominios de CDR que es un dominio de CDR3) orientado por medio de una región menos variable apropiada para mantener la conformación unida en el anticuerpo de origen.

De esta manera, aunque los anticuerpos preferidos

de la invención pueden comprender seis regiones CDR (tres de una cadena ligera y tres de una cadena pesada), se abarcan por la invención los anticuerpos con menos de seis regiones CDR y con tan pocas como una o dos regiones CDR. Además, también se contemplan anticuerpos con CDR de sólo la cadena pesada o cadena ligera.

Los anticuerpos preferidos de la invención que se unen a VEGF comprenden al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(a) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a ésta,

(b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a ésta, y

(c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a ésta.

Las regiones CDR de cadena pesada, preferidas para el uso en unión con las regiones CDR de cadena ligera, especificadas, se describen en otra parte de la presente. Sin embargo, también se contemplan otras regiones variables de cadena pesada que comprenden tres CDR para el uso en unión con las regiones variables de cadena ligera de la invención. Las regiones variables de cadena pesada, apropiadas, que se pueden usar en combinación con las regiones variables de cadena ligera de la invención y que

dan lugar a un anticuerpo que se une a VEGF se pueden identificar fácilmente por una persona experta en la técnica.

Por ejemplo, una región variable de cadena ligera de la invención se puede combinar con una región variable de cadena pesada individual o un repertorio de regiones variables de cadena pesada y los anticuerpos resultantes probados para la unión a VEGF. Se esperaría que un número razonable de estas combinaciones de regiones variables de cadena ligera de la invención con diferentes regiones variables de cadena pesada retendrían la capacidad para unirse a VEGF. En realidad, esto se ha demostrado con el anticuerpo preferido de la invención (r84/PGN311) donde se ha mostrado que el dominio VL de este anticuerpo se puede combinar con varios dominios VH diferentes y retener aún la capacidad para unirse a VEGF. En estos experimentos, 3 de 7 dominios VH que se probaron en combinación con el dominio VL del anticuerpo r84 mostraron unión significativa a VEGF, que es una proporción muy razonable y se evidencia que la región variable de cadena ligera de los anticuerpos de la invención es particularmente importante en la determinación de la especificidad de unión a VEGF y también que otras regiones variables de cadena pesada que se pueden combinar con las regiones variables de cadena ligera de la invención y que dan lugar a los anticuerpos que se unen a VEGF se pueden identificar fácilmente. Las regiones variables de cadena pesada, preferidas, para el uso en combinación con las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos de la invención son aquellos obtenidos o derivados de

anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se conoce que se unen a VEGF.

Se pueden usar métodos similares para identificar regiones variables de cadena ligera, alteARNtivas, para el uso en combinación con regiones variables de cadena pesada, preferidas, de la invención.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende toda o una porción de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. De manera preferente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1, o una porción de la misma. Adicionalmente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender toda o una porción de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, o una porción de la misma. Todas o parte de estas regiones constantes se pueden producir de manera natural o pueden ser completa o parcialmente sintéticas. En la técnica son bien conocidas y están bien documentadas las secuencias apropiadas para estas regiones constantes. Cuando se incluye en los anticuerpos de la invención un complemento completo de regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, estos anticuerpos se refieren típicamente en la presente como anticuerpos "de longitud completa" o anticuerpos "enteros".

Los anticuerpos que contienen una región Fc se prefieren para ciertos usos, particularmente usos terapéuticos *in vivo*, donde la región Fc media las funciones efectoras tal como ADCC y CDC.

El término "sustancialmente homólogo" como se usa en la presente en unión con una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico incluye secuencias que tienen al menos 70 % o 75 %, de manera preferente al menos 80 %, y de manera más preferente al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia a la secuencia descrita de aminoácidos o de ácido nucleico. Las secuencias sustancialmente homólogas de la invención incluyen de esta manera alteraciones individuales o múltiples de bases o aminoácidos (adiciones, sustituciones, inserciones o supresiones) a las secuencias de la invención. Al nivel de aminoácidos, las secuencias sustancialmente homólogas, preferidas, contienen sólo 1, 2, 3, 4 ó 5, preferentemente 1, 2 ó 3, más preferentemente 1 ó 2, aminoácidos alterados, en una o más de las regiones menos variables y/o una o más de las CDR que constituyen las secuencias de la invención. En estas alteraciones pueden ser con aminoácidos conservadores o no conservadores. De manera preferente, estas alteraciones son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Las secuencias sustancialmente homólogas de ácido nucleico también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridizan a las secuencias de ácido nucleico, descritas (o sus secuencias complementarias), por ejemplo, hibridizan a secuencias de nucleótidos que codifican para una o más de las CDR de cadena ligera o cadena pesada de la invención, las regiones variables de cadena ligera o pesada de la invención, o los anticuerpos de la invención (o hibridizan a sus secuencias complementarias), bajo al menos

condiciones de hibridación moderadamente severas.

El término "sustancialmente homólogo" también incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la presente invención que desempeñan sustancialmente la misma función como las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo (o el ácido nucleico sustancialmente homólogo que lo codifica) debe de retener la capacidad para unirse a VEGF como se describe anteriormente. De manera preferente, cualquier proteína de unión sustancialmente homóloga debe retener la capacidad para unirse de manera específica al mismo epítopo de VEGF como se reconoce por la proteína de unión en cuestión, por ejemplo, el mismo epítopo reconocido por los dominios de CDR de la invención o los dominios VH o VL de la invención como se describe en la presente. La unión al mismo epítopo/antígeno se puede probar fácilmente por métodos bien conocidos y descritos en la técnica, por ejemplo, usando ensayos de unión, por ejemplo, un ensayo de competición.

De esta manera, una persona experta en la técnica apreciará que se pueden usar ensayos de unión para probar si los anticuerpos "sustancialmente homólogos" tienen las mismas especificidades de unión como los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención, por ejemplo, ensayos de unión tal como ensayos de ELISA o ensayos de Biacore se pueden usar fácilmente para establecer si estos anticuerpos "sustancialmente homólogos" pueden unirse a

VEGF. Como se resume más adelante, se puede usar un ensayo de unión por competición para probar si los anticuerpos "sustancialmente homólogos" retienen la capacidad para unirse de manera específica a sustancialmente el mismo epítopo de VEGF como se reconoce por los anticuerpos de la invención. El método descrito más adelante es sólo un ejemplo de un ensayo adecuado de competición. La persona experta estará consciente de otros métodos y variaciones adecuadas.

Un ensayo de competición de ejemplo comprende la valoración de la unión de varias concentraciones efectivas de un anticuerpo de la invención a VEGF en la presencia de concentraciones variables de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, un anticuerpo sustancialmente homólogo). La cantidad de inhibición de unión inducida por el anticuerpo de prueba entonces se puede valorar. Un anticuerpo de prueba que muestra competición incrementada con un anticuerpo de la invención a concentraciones crecientes (es decir, concentraciones crecientes del anticuerpo de prueba dan por resultado una reducción correspondiente en la cantidad del anticuerpo de la invención que se une a VEGF) es evidencia de la unión a sustancialmente el mismo epítopo. De manera preferente, el anticuerpo de prueba reduce de manera significativa la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a VEGF. De manera preferente, el anticuerpo de prueba reduce la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a VEGF por al menos aproximadamente 80 %. Los ensayos de ELISA son apropiados para valorar la inhibición de la unión en este ensayo de competición pero

se conocerán, por la persona experta en la técnica, otras técnicas adecuadas.

Las secuencias sustancialmente homólogas de las proteínas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones conservadoras de aminoácidos, o por ejemplo, alteraciones que no afectan los dominios VH, VL o de CDR de los anticuerpos, por ejemplo, incluyen anticuerpos de scFv donde se usa una diferente secuencia ligadora o anticuerpos donde se adicionan secuencias de marca u otros componentes que no contribuyen a la unión del antígeno, o alteraciones para convertir un tipo o formato de molécula o fragmento de anticuerpo a otro tipo o formato de molécula o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, conversión de Fab a scFv o viceversa), o la conversión de una molécula de anticuerpo a una clase o subclase particular de molécula de anticuerpo (por ejemplo, la conversión de una molécula de anticuerpo a IgG o una subclase de la misma, por ejemplo, IgG1 o IgG3).

Una "sustitución conservadora de aminoácido", como se usa en la presente, es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, cisteína, alanina, valina, leucina,

isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

Se puede valorar la homología por cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de homología entre las secuencias, son útiles programas de computadora que hacen múltiples alineaciones de secuencia, por ejemplo, Clustal W (Thompson et al., 1994). Si se desea, se puede usar el algoritmo de Clustal W conjuntamente con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, 1992) y una penalidad de abertura de separación de 10 y una penalidad de extensión de separación de 0.1, de modo que se obtenga la correspondencia de mayor orden entre las dos secuencias en donde al menos 50 % de la longitud total de una de las secuencias está comprendida en la alineación. Otros métodos que se pueden usar para alinear secuencias son el método de alineación de Needleman y Wunsch (1970), como se revisa por Smith y Waterman (1981) de modo que se obtenga la correspondencia de mayor orden entre las dos secuencias y se determine el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos en general se reconocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos descritos por Carillo y Lipton (1988) y aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects.

En general, se emplearán programas de computadora para estos cálculos. Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, tal como ALIGN (Myers y Miller, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, 1988; Pearson, 1990) y BLAST con separación (Altschul et al., 1997), BLASTP, BLASTN, o GCG (Devereux et al., 1984) son también útiles para este propósito. Adicionalmente, el servidor Dali en el instituto europeo de bioinformática ofrece alineaciones basadas en estructura de secuencias de proteína (Holm, 1993; 1995; 1998).

A manera de proporcionar un punto de referencia, se pueden determinar secuencias de acuerdo a la presente invención que tienen 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología, o de identidad de secuencia, etc., usando el programa ALIGN con parámetros por defecto, (disponible en la Internet en el servidor de red de GENESTREAM, IGH, Montpellier, Francia).

Por "condiciones de hibridación al menos moderadamente severas" se quiere decir que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas complementarias de ácido nucleico en solución. La hibridación puede presentarse en toda o una porción de la molécula de la secuencia de ácido nucleico. La porción hibridizante es típicamente de al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30, 40 ó 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica reconocerán que se determina la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, por la Tm, que en amortiguadores que contienen sodio es una función de la concentración del ión sodio y la temperatura

(Tm = 81.5°C - 16.6 (Log10 [Na+]) + 0.41 (%(G+C)-600/1), o ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad híbrida son la concentración de ión sodio y la temperatura. A fin de identificar moléculas que son similares, pero no idénticas, a una molécula conocida de ácido nucleico, se puede asumir una mal correspondencia de 1 % como que da por resultado aproximadamente una disminución de 1°C en la Tm. Por ejemplo, si se buscan moléculas de ácido nucleico que tengan una identidad >95 %, la temperatura final de lavado se reducirá por aproximadamente 5°C. Con base en estas consideraciones, los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar fácilmente condiciones apropiadas de hibridación. En modalidades preferidas, se seleccionan condiciones severas de hibridación. A manera de ejemplo, se pueden emplear las siguientes condiciones para lograr hibridación severa: hibridación a 5x de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/5x de solución de Denhardt/1.0 % de SDS a Tm de -5°C con base en la ecuación anterior, seguido por un lavado de 0.2x SSC/0.1 % SDS a 60°C. Las condiciones de hibridación moderadamente severas incluyen un paso de lavado en 2x SSC a 42°C. a manera de ejemplo adicional, las secuencias que "hibridan" son aquellas secuencias que se unen (hibridan) bajo condiciones no severas (por ejemplo, 6 x SSC, 50 % de formamida a temperatura ambiente) y se lava bajo condiciones de baja severidad (por ejemplo, 2 x SSC, temperatura ambiente, de manera más preferente 2 x SSC, 42°C) o condiciones de alta severidad (por ejemplo, 2 x SSC, 65°C) (donde SSC = NaCl

0.15M, citrato de sodio 0.015M, pH 7.2).

Sin embargo, se entiende que se pueden lograr severidades equivalentes usando amortiguadores, sales y temperaturas alteARNtivas. La guía adicional con respecto a las condiciones de hibridación se puede encontrar en: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6 y en: Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3.

Hablando en general, se prefieren secuencias que hibridan bajo condiciones de alta severidad, puesto que son secuencias que, por la degeneración del código genético, hibridarán bajo condiciones de alta severidad.

En otras modalidades preferidas, se proporcionan anticuerpos de segunda generación que tienen propiedades mejoradas o superiores en comparación a un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, tal como r84. Por ejemplo, los anticuerpos de segunda generación pueden tener una mayor afinidad de unión, bloqueando más efectivamente la unión de VEGF al VEGFR2, bloqueando de manera más específica la unión de VEGF a VEGFR2, aún bloqueando menos la unión de VEGF a VEGFR1, capacidad mejorada para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, capacidad superior para inhibir la permeabilidad vascular inducida por VEGF, y de manera preferente, una capacidad incrementada para inhibir la angiogénesis inducida por VEGF *in vivo*, y para tratar enfermedades angiogénicas, incluyendo tumores vascularizados.

Se llevan a cabo y se cuantifican comparaciones para identificar anticuerpos efectivos de segunda generación, por ejemplo, usando uno o más de los varios ensayos descritos en detalle en la presente. Los anticuerpos de segunda generación que tienen una propiedad o actividad biológica mejorada de al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, y preferentemente, al menos aproximadamente 50 veces, en comparación a los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención, como se ejemplifica por el anticuerpo r84, se abarcan por la presente invención.

El anticuerpo, proteína de unión y moléculas de ácido nucleico de la invención en general son moléculas "aisladas" o "purificadas" en cuanto a que se distinguen de cualquier componente que puede estar presente *in situ* dentro de un cuerpo animal o humano o una muestra de tejido derivada de un cuerpo animal o humano. Sin embargo, las secuencias pueden corresponder a o ser sustancialmente homólogas a las secuencias como se encuentra en el cuerpo humano o animal. De esta manera, el término "aislada" o "purificada" como se usa en la presente en referencia a las moléculas o secuencias y proteínas o polipéptidos de ácido nucleico, por ejemplo, anticuerpos, se refiere a moléculas cuando se aíslan de, se purifican de, o están sustancialmente libres de su ambiente natural, por ejemplo, aisladas de o purificadas del cuerpo humano o animal (si en realidad se presentan de manera natural), o se refiere a estas moléculas cuando se producen por un proceso técnico, es decir, incluye moléculas recombinantes y producidas de

manera sintética.

De esta manera, cuando se usa en unión con una molécula de ácido nucleico, estos términos pueden referirse a un ácido nucleico sustancialmente libre de material con el cual está asociada en la naturaleza tal como otros ácidos nucleicos/genes o polipéptidos. Estos términos también pueden referirse a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o sustancialmente libre de precursores químicos, u otros químicos cuando se sintetiza de manera química. Un ácido nucleico aislado o purificado también puede estar sustancialmente libre de secuencias que flanquean de manera natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del cual se deriva el ácido nucleico o secuencias que se han hecho que flanqueen el ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de marca u otras secuencias que no tienen valor terapéutico) por ejemplo por ingeniería genética.

De esta manera, cuando se usa en unión con una molécula de proteína o polipéptido tal como CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera, CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada, regiones variables de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada, y proteínas de unión o anticuerpos de la invención, incluyendo anticuerpos de longitud completa, el término "aislada" o "purificada" se refiere típicamente a una proteína sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente de la cual se deriva. En algunas modalidades, particularmente donde la proteína se va a

administrar a humanos o animales, estas proteínas aisladas o purificadas están sustancialmente libres de medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan de manera química. Estas proteínas aisladas o purificadas también pueden estar libres de secuencias de flanqueo tal como aquellas descritas anteriormente para las moléculas aisladas de ácido nucleico.

El término "secuencia de ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" como se usa en la presente se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósidos o de nucleótidos compuestos de bases que se presentan de manera natural, azúcares y enlaces inter-azúcar (de estructura). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros que no se presentan de manera natural, o porciones de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases que se presentan de manera natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Los ejemplos de estas bases modificadas incluyen aza y desaza-adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser de doble hebra o de hebra individual. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser completamente o parcialmente sintéticas o recombinantes.

El término "humano" como se usa en la presente en

unión con moléculas de anticuerpo y proteínas de unión se refiere primero a anticuerpos y proteínas de unión que tienen regiones variables (por ejemplo, regiones $V_H$, $V_L$, CDR o FR) y opcionalmente, regiones constantes de anticuerpo, aisladas o derivadas de un repertorio humano o derivadas de o que corresponden a las secuencias encontradas en humanos, por ejemplo, en la línea germinal o células somáticas humanas. El anticuerpo r84 es un ejemplo de esta molécula de anticuerpo humano en donde se han aislado las regiones variables de un repertorio humano.

Los anticuerpos "humanos" y las proteínas de unión de la invención incluyen adicionalmente residuos de aminoácido no codificados por secuencias humanas, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio *in vitro*, por ejemplo mutaciones introducidas por clonación *in vitro* o PCR. Los ejemplos particulares de estas mutaciones son mutaciones que comprenden sustituciones conservadoras u otras mutaciones en un pequeño número de residuos del anticuerpo o proteína de unión, por ejemplo, en 5, 4, 3, 2 ó 1 de los residuos del anticuerpo o proteína de unión, preferentemente por ejemplo en 5, 4, 3, 2 ó 1 de los residuos que constituyen una o más de las CDR del anticuerpo o proteína de unión. Ciertos ejemplos de estos anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos y regiones variables que se han sometido a técnicas normales de modificación para reducir la cantidad de sitios potencialmente inmunogénicos.

De esta manera, los anticuerpos "humanos" de la invención incluyen secuencias derivadas de y relacionadas a

las secuencias encontradas en humanos, pero que no pueden existir de manera natural dentro del repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos, *in vivo*. Además, los anticuerpos humanos y proteínas humanas de unión de la presente invención incluyen proteínas que comprenden secuencias humanas de consenso identificadas a partir de secuencias humanas, o secuencias sustancialmente homólogas a secuencias humanas.

Además, los anticuerpos humanos y proteínas de unión de la presente invención no se limitan a combinaciones de las regiones $V_H$, $V_L$, CDR o FR que se encuentran por sí mismas en combinación en moléculas de anticuerpos humanos. De esta manera, los anticuerpos humanos y proteínas de unión de la invención pueden incluir o corresponder a combinaciones de estas regiones tal que no existan necesariamente de manera natural en humanos.

En modalidades preferidas, los anticuerpos humanos serán anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos "completamente humanos", como se usa en la presente, son anticuerpos que comprenden CDR y/o dominios de región variable "humanos" como se define anteriormente, sin secuencias sustanciales no humanas de anticuerpo o sin ninguna secuencia no humana de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden CDR y/o dominios de región variable, humanos, "sin secuencias sustanciales no humanas de anticuerpo" son anticuerpos, dominios y/o CDR en los cuales sólo aproximadamente 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácido son aminoácidos que no se codifican por secuencias humanas de anticuerpo. De esta manera, los anticuerpos "completamente

humanos" se distinguen de los anticuerpos "humanizados", que se basan en dominios sustancialmente no humanos de región variable, por ejemplo, dominios de región variable de ratón, en los cuales se han cambiado ciertos aminoácidos para corresponder mejor con los aminoácidos típicamente presentes en los anticuerpos humanos.

Los anticuerpos "completamente humanos" de la invención pueden ser CDR y/o dominios de región variable, humanos, sin ninguna otra secuencia sustancial de anticuerpo, tal como que son anticuerpos de cadena individual. De manera alteARNtiva, los anticuerpos "completamente humanos" de la invención pueden ser CDR y/o dominios de región variable, humanos, integrales con o unidos de manera operativa a una o más regiones constantes de anticuerpo de humano. Ciertos anticuerpos preferidos completamente humanos son anticuerpos tipo IgG con el complemento completo de regiones constantes de IgG.

En otras modalidades, los anticuerpos "humanos" de la invención serán anticuerpos quiméricos humanos en parte. Los anticuerpos "quiméricos humanos en parte", como se usan en la presente, son anticuerpos que comprenden CDR y/o dominios de región variable "humanos" operativamente unidos a, o injertados en, una región constante de una especie no humana, tal como rata o ratón. Estos anticuerpos quiméricos en parte humanos se pueden usar, por ejemplo, en estudios preclínicos, en donde la región constante será preferentemente de la misma especie de animal usada en la prueba pre-clínica. Estos anticuerpos quiméricos humanos en parte también se pueden usar, por

ejemplo, en diagnósticos *ex vivo*, en donde la región constante de la especie no humana puede proporcionar opciones adicionales para la detección de anticuerpos.

El término "fragmento" como se usa en la presente se refiere a fragmentos de pertinencia biológica, por ejemplo, fragmentos que contribuyen a la unión a antígeno, por ejemplo, forman parte del sitio de unión a antígeno, y/o contribuyen a la inhibición o reducción en la función del antígeno de VEGF y/o contribuyen a la prevención del antígeno de VEGF que interactúa con el ligando natural, VEGFR2. Ciertos fragmentos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada (dominio $V_H$) y/o una región variable de cadena ligera (dominio $V_L$) de los anticuerpos de la invención. Otros fragmentos preferidos comprenden una o más de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos de la invención (o de los dominios $V_H$ de la invención), o una o más de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos de la invención (o de los dominios $V_L$ de la invención). Ciertos fragmentos preferidos son al menos de 5 aminoácidos de longitud y comprende al menos una región CDR, preferentemente una región CDR3, más preferentemente una región CDR3 de cadena pesada.

En las modalidades donde los anticuerpos de la invención comprenden un fragmento de cualquiera de las secuencias definidas (por ejemplo comprenden un fragmento de SEQ ID NO: 21, por ejemplo, son anticuerpos que comprenden dominios $V_H$ y/o $V_L$ de la invención, o son anticuerpos o proteínas de unión que comprenden una o más CDR de la invención, entonces estas regiones/dominios se

separan en general dentro del anticuerpo o proteína de unión de modo que cada región/dominio puede desempeñar su función biológica y de modo que se retenga la contribución a la unión al antígeno. De esta manera, los dominios $V_H$ y $V_L$ se separan preferentemente por secuencias núcleo apropiadas/secuencias ligadoras apropiadas y las CDR se separan preferentemente por regiones menos variables apropiadas tal como aquellas encontradas en los anticuerpos que se presentan de manera natural y/o anticuerpos efectivos creados por ingeniería. De esta manera, las secuencias de $V_H$, $V_L$ y CDR, individuales de la invención se proporcionan preferentemente dentro de, o se incorporan en, una región menos variable o región núcleo apropiada para permitir la unión al antígeno. Estas secuencias o regiones menos variables pueden corresponder a las regiones menos variables que se presentan de manera natural, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, como sea apropiado para formar un núcleo apropiado, o pueden corresponder a regiones menos variables de consenso, por ejemplo, identificadas al comparar varias regiones menos variables que se presentan de manera natural. De manera alteARNtiva, se pueden usar regiones núcleo o menos variables no de anticuerpo, por ejemplo, regiones menos variables del receptor de células T.

Las secuencias apropiadas que se pueden usar para las regiones menos variables son bien conocidas y están documentadas en la técnica y se puede usar cualquiera de éstas. Las regiones preferidas para las regiones menos variables son una o más de las regiones menos variables que constituyen los dominios $V_H$ y/o $V_L$ de la invención, es

decir, una o más de las regiones menos variables descritas en SEQ ID NO: 21 o en la Tabla 1, o regiones menos variables sustancialmente homólogas a éstas, y en particular regiones menos variables que permiten el mantenimiento de la especificidad al antígeno, por ejemplo regiones menos variables que dan por resultado sustancialmente la misma estructura 3D del anticuerpo. En ciertas modalidades preferidas, las cuatro cadenas ligeras variables (SEQ ID NOs: 15, 16, 17 y 18) y/o cadenas pesadas variables (SEQ ID NO2: 11, 12, 13 y 14), como sea apropiado, regiones FR de SEQ ID NO: 21 (también mostradas en la Tabla 1), o regiones FR sustancialmente homólogas a éstas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

Además, aunque los anticuerpos preferidos de la invención están constituidos de $V_H$, $V_L$ o CDR de la invención, se debe señalar que los anticuerpos de la invención también abarcan uno o más de $V_H$, $V_L$ o CDR de la invención en combinación con otros $V_H$, $V_L$ o CDR no de al invención, con la condición que las propiedades de unión a VEGF de los anticuerpos o las proteínas de unión de la invención como se resume anteriormente aún estén presentes.

El término "región determinante de complementariedad de cadena pesada" ("CDR de cadena pesada") como se usa en la presente se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena pesada (dominio $V_H$) de una molécula de anticuerpo. La región variable de cadena pesada tiene tres CDR llamadas CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada del término amino al término carboxi. La

región variable de cadena pesada tiene también cuatro regiones menos variables (FR1, FR2, FR3 y FR4 del término amino al término carboxi). Estas regiones menos variables separan las CDR.

El término "región variable de cadena pesada" (dominio $V_H$) como se usa en la presente se refiere a la región variable de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo.

El término "región determinante de complementariedad de cadena ligera" ("CDR de cadena ligera") como se usa en la presente se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena ligera (dominio $V_L$) de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de cadena ligera tienen tres CDR llamadas CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera del término amino al término carboxi. La región variable de cadena ligera también tiene cuatro regiones menos variables (FR1, FR2, FR3 y FR4 del término amino al término carboxi). Estas regiones menos variables separan las CDR.

El término "región variable de cadena ligera" (dominio $V_L$) como se usa en la presente se refiere a la región variable de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

Se debe señalar que la nomenclatura Kabat se sigue en la presente, donde es necesario, a fin de definir la posición de las CDR (Kabat et al., 1991, incorporado específicamente en la presente como referencia).

Una persona experta en la técnica apreciará que

las proteínas y polipéptidos de la invención, tal como las CDR ligeras y pesadas, las regiones variables de cadena ligera y pesada, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoconjugados, se pueden preparar de cualquiera de varias maneras bien conocidas y descritas en la técnica, pero se preparan más preferentemente usando métodos recombinantes.

Los fragmentos de ácido nucleico que codifican para las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la invención se pueden derivar o producir por cualquier método apropiado, por ejemplo, por clonación o síntesis. Por ejemplo, estas secuencias se pueden preparar al clonar secuencias apropiadas por ejemplo de genes de línea germinal humana y entonces haciendo cualquier modificación necesaria a las secuencias de línea germinal para obtener las secuencias de la invención usando métodos bien conocidos y descritos en la técnica. Un método alteARNtivo y más eficiente sería sintetizar la secuencia apropiada de la región variable de cadena ligera o pesada como cebadores de traslape, y usar la extensión del cebador para obtener la secuencia completa. Esta secuencia completa entonces se puede amplificar mediante PCR con cebadores que contienen sitios apropiados de restricción para clonación y manipulación adicional, por ejemplo, para clonación en un vector apropiado de expresión. Normalmente van a ser suficientes de cinco a siete cebadores de traslape por región variable, haciendo de este modo esta técnica muy eficiente y precisa.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de

ácido nucleico que codifican para las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la invención, estos fragmentos se pueden manipular adicionalmente por técnicas normales de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los fragmentos de región variable en moléculas de anticuerpo de longitud completa con dominios apropiados de región constante, o en formatos particulares de fragmentos de anticuerpo, analizados en otra parte de la presente, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos scFv, etc. Típicamente, o como parte de este procedimiento adicional de manipulación, los fragmentos de ácido nucleico que codifican para las moléculas de anticuerpo de la invención se incorporan en general en un vector apropiado de expresión a fin de facilitar la producción de los anticuerpos de la invención.

Los posibles vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos, o virus modificados (por ejemplo, retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), en tanto que el vector sea compatible con la célula hospedadora usada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula hospedadora", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas con base en las células hospedadoras que se van a usar para la expresión, que se enlazan de manera operativa a la molécula de ácido nucleico. Operativamente enlazado se propone que signifique que el ácido nucleico se enlaza a secuencias reguladoras de una manera que permite

la expresión del ácido nucleico.

Por lo tanto, la invención contempla un vector de expresión recombinante que tiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Las secuencias reguladoras adecuadas se pueden derivar de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, mamíferos o insectil (por ejemplo, ver las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, 1990). La selección de secuencias reguladoras apropiadas es dependiente de la célula hospedadora elegida como se analiza más adelante, y se puede lograr fácilmente por un experto en la técnica. Los ejemplos de estas secuencias reguladoras incluyen: secuencia promotora transcripcional e intensificadora o secuencia de unión a ARN-polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, incluyendo una señal de inicio de traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula hospedadora elegida y del vector empleado, se pueden incorporar en el vector de expresión otras secuencias, tal como un origen de replicación, sitios adicionales de restricción de ADN, intensificadores, y secuencias que confieren inductivilidad de transcripción.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de las células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula

recombinante de la invención. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables son genes que codifican para una proteína tal como neomicina e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β-galactosidasa, cloranfenicol-acetiltransferasa, luciferasa de luciéARNga, o una inmunoglobulina o porción de la misma tal como la porción Fc de una inmunoglobulina preferentemente IgG. La transcripción del gen marcador seleccionable se monitoriza por los cambios en la concentración de la proteína marcadora seleccionable tal como β-galactosidasa, cloranfenicol-acetiltransferasa, o luciferasa de luciéARNga. Si el gen marcador seleccionable codifica para una proteína que confiere resistencia a antibióticos tal como resistencia a neomicina, se pueden seleccionar células transformantes con G418. Las células que tienen incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, en tanto que las otras células morirán. Esto hace posible visualizar y valorar la expresión de los vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación en la expresión y fenotipo. Se apreciará que se pueden introducir marcadores seleccionables en un vector separado del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinante también pueden contener genes que codifican para una porción de fusión que proporciona expresión incrementada de la proteína recombinante; solubilidad incrementada de la proteína recombinante; y ayuda en la purificación de la proteína recombinante objetivo al actuar como un ligando en

la purificación por afinidad (por ejemplo, pueden estar presentes "marcas" apropiadas para permitir la purificación y/o identificación, por ejemplo, marcas de His o marcas de myc). Por ejemplo, se puede adicionar un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante objetivo para permitir la separación de la proteína recombinante de la porción de fusión subsiguiente a la purificación de la proteína de fusión. Los vectores típicos de expresión de fusión incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutationa-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.

Se pueden introducir vectores de expresión recombinante en células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformada. Los términos "transformada con", "transfectada con", "transformación" y "transfección" se propone que abarquen introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula por una de muchas técnicas posibles conocidas en la técnica. El término "célula hospedadora transformada" como se usa en la presente se propone que incluya también células capaces de la glicosilación que se han transformado con un vector de expresión recombinante de la invención. Se pueden transformar células procarióticas con ácido nucleico, por ejemplo, por electroporación o transformación mediada con cloruro de calcio. Por ejemplo, se puede introducir ácido nucleico en células mamíferas mediante técnicas convencionales tal como co-precipitación con fosfato de

calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Los métodos adecuados para transformar y transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook et al., 1989, y en otros textos de laboratorio.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen una amplia variedad de células hospedadoras eucarióticas y células hospedadoras procarióticas. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células de levadura o en células mamíferas. Se pueden encontrar otras células hospedadoras adecuadas en Goeddel, 1990. Además, las proteínas de la invención se pueden expresar en células procarióticas, tal como Escherichia coli (Zhang et al., 2004).

Las células hospedadoras fungoideas y de levadura adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a Saccharomyces cerevisiae, los géneros Pichia o Klyveromyces y varias especies del género Aspergillus. Los ejemplos de vectores para la expresión en levadura S. cerevisiae incluyen pYepSecI (Baldari, et al., 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982), pJRY88 (Schultz et al., 1987) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Por los expertos en la técnica son bien conocidos los protocolos para la transformación de levadura y hongos (ver Hinnen et al., 1978; Ito et al., 1983, y Cullen et al., 1987).

Las células mamíferas adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, entre otras: células COS (por ejemplo, ATCC número CRL 1650 ó 1651), BHK (por

ejemplo, ATCC número CRL 6281), CHO (ATCC número CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC número CCL 2), 293 (ATCC número 1573) y NS-1. Los vectores adecuados de expresión para dirigir la expresión en células mamíferas incluyen en general un promotor (por ejemplo, derivado de material viral tal como polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus 40 Simiesco), así como otras secuencias de control transcripcional y transduccional. Los ejemplos de vectores de expresión mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, B., 1987) y pMT2PC (Kaufman et al., 1987).

Dadas las enseñanzas proporcionadas en la presente, también se pueden lograr fácilmente promotores, terminadores, y métodos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado en células vegetales, avícolas e insectiles. Por ejemplo, dentro de una modalidad, las proteínas de la invención se pueden expresar de células vegetales (ver Sinkar et al., 1987, que revisa el uso de vectores de Agrobacterium rhizogenes; ver también Zambryski et al., 1984, que describe el uso de vectores de expresión para células vegetales, que incluyen, entre otros, PAPS2022, PAPS2023, y PAPS2034).

Las células de insecto adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen células y líneas celulares de las especies Bombyx, Trichoplusia o Spodotera. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células insectiles cultivadas (células SF 9) incluyen la serie pAc (Smith et al., 1983) y la serie pVL (Luckow y Summers 1989). Algunos sistemas de expresión celular de baculovirus-insecto para la expresión de las

proteínas recombinantes de la invención se describen en la PCT/US/02442.

De manera alteARNtiva, las proteínas de la invención también se pueden expresar en animales transgénicos no humanos tal como ratas, conejos, oveja y cerdos (Hammer et al., 1985; Palmiter et al., 1983; Brinster et al., 1985; Palmiter y Brinster 1985, y patente de los Estados Unidos número 4,736,866).

Las proteínas de la invención también se pueden preparar por síntesis química usando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tal como síntesis en fase sólida (Merrifield (1964); Frische et al., 1996) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, 1987).

Las proteínas de fusión N-terminales o C-terminales que comprenden los anticuerpos y proteínas de la invención, conjugados a otras moléculas, tal como proteínas, se pueden preparar por fusión a través de técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen un anticuerpo o proteína de la invención fusionado a la proteína seleccionada o proteína marcadora, o proteína de marca como se describe en la presente. Los anticuerpos y proteínas de la invención también se pueden conjugar a otras proteínas por técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas se pueden acoplar usando ligadores que contienen tiol heterobifuncional como se describe en la WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditio-propionato) o N-succinimidil-5-tioacetato. Los ejemplos de proteínas que se pueden usar para preparar proteínas de fusión, o conjugados, incluyen proteínas de

unión celular tal como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, lipoproteína de baja densidad, glucagon, endorfinas, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína glutationa-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA), y myc truncado.

Independientemente de la manera de preparación de un primer segmento de ácido nucleico de anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, se pueden preparar fácilmente segmentos adicionales adecuados de ácido nucleico de anticuerpo por técnicas normales de biología molecular. A fin de confirmar que cualquier segmento variante, mutante o de segunda generación de ácido nucleico de anticuerpo anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, es adecuado para el uso en la presente invención, el segmento de ácido nucleico se probará para confirmar la expresión de un anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de acuerdo con la presente invención. De manera preferente, el segmento variante, mutante o de segunda generación de ácido nucleico, también se probará para confirmar la hibridación bajo condiciones de hibridación normales, más preferentemente normales, severas. Las condiciones de hibridación, adecuadas, de ejemplo, incluyen hibridación en aproximadamente 7 % de dodecil-sulfato de sodio (SDS), aproximadamente $NaPO_4$ 0.5 M, aproximadamente EDTA 1 mM a aproximadamente 50°C; y lavado con aproximadamente 1 % de SDS a aproximadamente 42°C.

Puesto que se puede preparar fácilmente una variedad de anticuerpos humanos, los métodos de tratamiento de la presente invención se pueden ejecutar al proporcionar

al animal o paciente al menos un primer segmento o molécula de ácido nucleico que expresa una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención en el paciente. El "segmento o molécula de ácido nucleico que expresa un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2" estará en general en la forma de al menos un vector o construcción de expresión, y puede estar en la forma de un vector o construcción de expresión comprendido dentro de un virus o dentro de una célula hospedadora recombinante. Los vectores preferidos de terapia génica de la presente invención serán en general vectores virales, tal como comprendidos dentro de un retrovirus recombinante, virus de herpes simple (HSV), adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), citomegalovirus (CMV), y similares.

De esta manera, esta invención proporciona además segmentos o moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para los anticuerpos de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas a estas secuencias también se incluyen. Las moléculas preferidas de ácido nucleico codifican para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21. Las moléculas más preferidas de ácido nucleico comprenden la secuencia de ácido nucleico como se define en SEQ ID NO: 20 o una secuencia sustancialmente homóloga a ésta.

Un aspecto aún adicional proporciona una construcción de expresión o vector de expresión que comprende uno o más de los segmentos o moléculas de ácido

nucleico de la invención. De manera preferente, las construcciones o vectores de expresión son recombinantes. De manera preferente, estas construcciones o vectores comprenden adicionalmente las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Un aspecto aún adicional proporciona una célula hospedadora o virus que comprende una o más construcciones de expresión o vectores de expresión de la invención. También se proporcionan células hospedadoras o virus que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Una célula hospedadora o virus que expresa un anticuerpo de la invención forma un aspecto aún adicional.

Un aspecto aún adicional de la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la presente invención que comprende el paso de cultivar las células hospedadoras de la invención. Los métodos preferidos comprenden los pasos de (i) cultivar una célula hospedadora que comprende uno o más de los vectores de expresión recombinante o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o proteína codificada; y opcionalmente (ii) aislar el anticuerpo o proteína de la célula hospedadora o del medio de crecimiento/sobrenadante. Estos métodos de producción también pueden comprender un paso de purificación del anticuerpo o producto de proteína y/o formular el anticuerpo o producto en una composición

que incluye al menos un componente adicional, tal como un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En modalidades cuando el anticuerpo o proteína de la invención está constituido de más de una cadena de polipéptido (por ejemplo, ciertos fragmentos tal como fragmentos Fab), entonces todos los polipéptidos se expresan de manera preferente en la célula hospedadora, ya sea del mismo o diferente vector de expresión, de modo que las proteínas completas, por ejemplo, proteínas de unión de la invención, pueden ensamblarse en la célula hospedadora y ser aisladas o purificadas de la misma.

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para producir anticuerpos adicionales que se unen a VEGF. Estos usos comprenden por ejemplo la adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de origen para formar un nuevo anticuerpo, en donde el anticuerpo de origen es uno de los anticuerpos de la invención como se define en otra parte de la presente, y probar el nuevo anticuerpo resultante para identificar anticuerpos específicos para VEGF. Estos métodos se pueden usar para formar múltiples anticuerpos novedosos que se pueden probar todos para su capacidad para unirse a VEGF. De manera preferente, la adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos toma lugar en uno o más de los dominios de CDR.

Esta mutación o modificación a un anticuerpo de origen se puede llevar a cabo de cualquier manera apropiada usando técnicas bien conocidas y documentadas, por ejemplo

al llevar a cabo métodos de mutagénesis aleatoria o dirigida. Si se va a usar mutagénesis dirigida, entonces una estrategia para identificar residuos apropiados para la mutagénesis utiliza la resolución de la estructura cristalina del complejo de proteína de unión-antígeno, por ejemplo, el complejo Ab-Ag, para identificar los residuos claves comprendidos en la unión al antígeno (Davies y Cohen, 1996). De manera subsiguiente, estos residuos se pueden mutar para mejorar la interacción. De manera alteARNtiva, uno o más de los residuos de aminoácido se pueden simplemente seleccionar como objetivo para mutagénesis dirigida y se valora el efecto en la unión a células tumorales.

Se puede llevar a cabo la mutagénesis aleatoria de cualquier manera apropiada, por ejemplo, mediante PCR propensa a error, transposición de cadena o cepas mutadoras de E. coli.

De esta manera, uno o más de los dominios $V_H$ de la invención se pueden combinar con un dominio $V_L$ individual o un repertorio de dominios $V_L$ de cualquier fuente apropiada y los nuevos anticuerpos resultantes se prueban para identificar anticuerpos específicos para VEGF. Contrariamente, uno o más de los dominios $V_L$ de la invención se pueden combinar con un dominio $V_H$ individual o un repertorio de dominios $V_H$ de cualquier fuente apropiada y los nuevos anticuerpos resultantes se prueban para identificar anticuerpos específicos para VEGF. Por ejemplo, como se analiza anteriormente, se ha mostrado que el dominio $V_L$ del anticuerpo preferido de la invención

(r84/PGN311) se puede combinar con varios dominios $V_H$ diferentes y aún retener la capacidad para unirse a VEGF.

De manera similar, uno o más, o preferentemente las tres CDR de los dominios $V_H$ y/o $V_L$ de la invención se pueden injertar en un dominio $V_H$ y/o $V_L$ individual o un repertorio de dominios $V_H$ y/o $V_L$, como sea apropiado, y los nuevos anticuerpos resultantes se prueban para identificar anticuerpos específicos para VEGF.

Las mutaciones seleccionadas de las CDR, especialmente CDR3 de las cadenas ligera y/o pesada, se han mostrado que son una técnica efectiva para incrementar la afinidad del anticuerpo y se prefieren. De manera preferente, se seleccionan como objetivo para mutagénesis bloques de 3 a 4 aminoácidos de la CDR3 o regiones específicas llamadas "puntos activos".

Los "puntos activos" son las secuencias donde toma lugar *in vivo* la hipermutación somática (Neuberger y Milstein, 1995). Las secuencias de los puntos activos se pueden definir como secuencias de nucleótidos de consenso en ciertos codones. La secuencia de consenso es el tetranucleótido, RGYW, en el cual R puede ser ya sea A o G, Y puede ser C o T y W puede ser ya sea A o T (Neuberger y Milstein, 1995). Además, los residuos de serina codificados por los nucleótidos AGY están predominantemente presentes en las regiones CDR del dominio variable sobre aquellas codificadas por TCN que corresponden a potencial de secuencias de puntos activos (Wagner et al., 1995).

De esta manera, la secuencia de nucleótidos de las CDR de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo

de la invención se puede explorar para la presencia de las secuencias de puntos activos y los codones de AGY. Los puntos activos identificados de las regiones CDR de la cadena ligera y pesada entonces se pueden comparar opcionalmente a las secuencias germinales de las cadenas pesada y ligera usando la base de datos InteARNtional ImMunoGen Tics database (IMGT, http://imgt.cines.fr/textes/vquest/) (Davies et al., 1990). Una secuencia, idéntica a la línea germinal, sugiere que no se ha presentado mutación somática; por lo tanto se pueden introducir mutaciones aleatorias que imitan los eventos somáticos que se presentan *in vivo* o de manera alteARNtiva, se puede llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, en los puntos activos y/o codones de AGY. En contraste, una diferente secuencia muestra que se han presentado ya algunas mutaciones somáticas. Permanecerá por ser determinado si fue óptima la mutación somática *in vivo*.

Los puntos activos preferidos para la mutación son aquellos que codifican para aminoácidos expuestos y preferentemente aquellos que codifican para aminoácidos que forman parte de los sitios de unión a antígeno. Otros puntos activos preferidos para la mutación son aquellos que codifican para aminoácidos no conservados. Los puntos activos que codifican para aminoácidos ocultos o conservados dentro de las CDR preferentemente no están mutageneizados. Estos residuos usualmente son críticos para la estructura completa y es improbable que interactúen con el antígeno puesto que están ocultos.

Son bien conocidos para la persona experta en la técnica los métodos para llevar a cabo la manipulación descrita anteriormente de aminoácidos y dominios de proteína. Por ejemplo, estas manipulaciones se pueden llevar a cabo de manera conveniente por ingeniería genética al nivel de ácido nucleico en donde se modifican moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas apropiadas de unión y dominios de las mismas, tal que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada resultante se modifique a su vez de la manera apropiada.

Se puede llevar a cabo la prueba de la capacidad de uno o más anticuerpos nuevos para unirse de manera específica a VEGF por cualquier método apropiado, que es bien conocido y se ha descrito en la técnica. Están ampliamente disponibles muestras de VEGF (ver los ejemplos) y éstas se pueden usar fácilmente para valorar la unión, por ejemplo por métodos convencionales tal como ELISA, cromatografía de afinidad, etc.

Los nuevos anticuerpos producidos por estos métodos tendrán preferentemente una mayor o mejorada afinidad (o al menos una afinidad equivalente) para VEGF como los anticuerpos de origen y se pueden tratar y usar de la misma manera como los anticuerpos de la invención como se describe en otra parte de la presente (por ejemplo, para terapia, diagnosis, en composiciones, etc.).

Los nuevos anticuerpos producidos, obtenidos u obtenibles por estos métodos forman un aspecto aún adicional de la invención.

Esta invención proporciona además composiciones

que comprenden al menos un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo de la invención, que incluye opcionalmente un diluyente. Estas composiciones pueden ser composiciones farmacéuticamente aceptables o composiciones para el uso en estudios de laboratorio. En términos de las composiciones farmacéuticas, se pueden formular de manera preferente para administración parenteral, tal como para administración intravenosa, o para administración ocular.

La presente invención proporciona varios métodos y usos de los anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo de la invención. Con respecto a todos los métodos, los términos "un" y "una" se usan para querer decir "al menos uno", "al menos un primer", "uno o más" o "una pluralidad" de pasos en los métodos citados, excepto donde se señale de manera específica. Esto es particularmente pertinente a los pasos de administración en los métodos de tratamiento. De esta manera, no sólo se pueden emplear diferentes dosis con la presente invención, sino que se pueden usar diferentes números de dosis, por ejemplo, inyecciones, hasta e incluyendo inyecciones múltiples. Se pueden usar productos terapéuticos combinados, administrados antes, después o durante la administración del anticuerpo terapéutico anti-VEGF.

Los varios métodos *in vitro* útiles y usos de los anticuerpos de la invención se proporcionan que tienen implicaciones biológicas importantes. Primero se proporcionan métodos de, y usos en, la unión de VEGF, que comprende en general poner en contacto de manera efectiva una composición que comprende VEGF, preferentemente VEGF

libre (no unido a receptor) con al menos un primer anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los métodos de, y usos en, la detección de VEGF se proporcionan, que comprenden en general poner en contacto una composición sospechosa de contener VEGF con al menos un primer anticuerpo humano de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo y detectar los complejos formados de esta manera. Los métodos de detección y usos se pueden usar en unión con muestras biológicas, por ejemplo, en la diagnosis para angiogénesis y tumores, y también se proporcionan kits de diagnóstico basados en los mismos.

La presente invención proporciona métodos de, y usos en, preferentemente o de manera específica la inhibición de la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2, que comprende en general poner en contacto, en la presencia de VEGF, una población de células o tejidos que incluye células endoteliales que expresan VEGFR2 (KDR/Flk-1) con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones efectivas para inhibir la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2.

También se proporcionan los métodos de, y usos en, inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2, sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR1.

Estos métodos comprenden poner en contacto, en la presencia de VEGF, una población de células o tejidos que incluye una población de células endoteliales que expresa VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR1 (Flt-1) con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones efectivas para inhibir la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2, sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR1.

Los métodos y usos adicionales de la invención son el análisis de los papeles biológicos de los receptores de VEGF, llamados VEGFR2 y VEGFR1, que comprenden los pasos de:

(a) poner en contacto una composición biológica o tejido que comprende VEGF y una población de células que expresan los receptores VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR1 (Flt-1) con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y

(b) determinar el efecto del anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención en al menos una primera respuesta biológica a VEGF; en donde:

(i) una alteración en una respuesta biológica en la presencia del anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención es indicativa de una respuesta mediada por el receptor de VEGFR2; y

(ii) el mantenimiento de una respuesta biológica

en la presencia del anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención es indicativa de una respuesta mediada por el receptor de VEGFR1.

Se proporcionan métodos y usos de inhibición de proliferación, incluyendo aquellos para inhibir de manera específica la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, que comprende en general poner en contacto una población de células o tejidos que incluyen una población de células endoteliales y VEGF con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, bajo condiciones efectivas para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF.

También se proporcionan métodos de, y usos en, inhibir la función de macrófagos inducida por VEGFR2, que comprende en general poner en contacto una población de células o tejidos que contienen macrófagos y VEGF con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-VEGF, bajo condiciones efectivas para inhibir la función de macrófagos inducida por VEGFR2.

Los métodos anteriores se aplican preferentemente en el tratamiento de tumores, en donde los métodos inhiben la función de macrófagos inducida por VEGFR2, reduciendo de

este modo la capacidad de los macrófagos infiltrantes de tumor, que expresan VEGFR2, para promover el progreso y/o metástasis tumoral.

Se proporcionan adicionalmente métodos de, y usos en, inhibir proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGFR2, y opcionalmente, angiogénesis, sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condroclastos mediada por VEGFR1. Los métodos comprenden en general poner en contacto una población de células o tejidos que contienen células endoteliales y al menos uno de osteoclastos y condroclastos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, bajo condiciones efectivas para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, o angiogénesis, sin inhibir significativamente la estimulación de osteoclastos o condroclastos mediada por VEGFR1.

Los métodos y usos anteriores se pueden realizar *in vitro* e *in vivo*, en este último caso, en donde los tejidos o células se colocan dentro de un animal y el anticuerpo humano anti-VEGF se administra al animal. En ambos casos, los métodos y usos llegan a ser métodos y usos para inhibir la angiogénesis, que comprenden poner en contacto un tejido que comprende, o una población de, vasos sanguíneos angiogénicos o potencialmente angiogénicos, es decir, aquellos expuestos a o potencialmente expuestos a

VEGF, con una composición anti-angiogénica que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones efectivas para inhibir la angiogénesis.

Donde se mantienen *ex vivo* poblaciones de vasos sanguíneos potencialmente angiogénicos, la presente invención tiene utilidad en programas de descubrimiento de fármacos. Los ensayos de selección *in vitro,* con controles positivos y negativos confiables, son útiles como un primer paso en el desarrollo de fármacos para inhibir o promover la angiogénesis, así como en la delineación de información adicional en el proceso angiogénico. Donde la población de vasos sanguíneos potencialmente angiogénicos se localiza dentro de un animal o paciente, la composición anti-angiogénica se administra al animal como una forma de terapia.

Las "cantidades biológicamente efectivas", en términos de cada uno de los métodos inhibitorios anteriores son por lo tanto cantidades de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención, efectivas para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF; para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, sin inhibir de manera significativa eventos celulares inducidos por VEGFR1; para inducir la proliferación y/o migración de células endoteliales inducida por VEGF, o angiogénesis, sin inhibir de manera significativa la estimulación de osteoclastos o

condroclastos mediada por VEGFR1; y en conjunto, para reducir la proliferación y/o migración de células endoteliales vasculares de una manera efectiva para inhibir el crecimiento o angiogénesis de vasos sanguíneos.

La invención proporciona de esta manera métodos de, y usos en, inhibir angiogénesis inducida por VEGF, y de manera preferente, para tratar una enfermedad angiogénica, sin inhibir de manera significativa la estimulación de osteoclastos o condroclastos mediada por VEGF. Los métodos comprenden en general poner en contacto una población de células o tejidos que contienen células endoteliales y al menos uno de osteoclastos o condroclastos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, bajo condiciones efectivas para inhibir la angiogénesis inducida por VEGF y para tratar una enfermedad angiogénica sin inhibir de manera significa la estimulación de osteoclastos o condroclastos mediada por VEGF.

Se proporcionan además métodos de, y usos en, inhibir angiogénesis inducida por VEGF, y de manera preferente, para tratar una enfermedad angiogénica, sin provocar efectos secundarios significativos en el metabolismo óseo. Los métodos comprenden en general poner en contacto un tejido o una población de vasos angiogénicos que contienen células endoteliales vasculares y al menos uno de osteoclastos o condroclastos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al

menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones efectivas para inhibir la angiogénesis inducida por VEGF, y para tratar una enfermedad angiogénica, sin provocar efectos secundarios significativos en el metabolismo óseo al no deteriorar de manera significativa las actividades de los osteoclastos o condroclastos.

Se proporcionan selección de fármacos anti-angiogénicos (*in vitro*) y terapia (*in vivo*) en términos de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por vascularización indeseable, inapropiada, anormal, excesiva y/o patológica. Es bien conocido por los expertos en la técnica que puesto que la angiogénesis anormal se presenta en una amplia variedad de enfermedades y trastornos, se puede usar una terapia determinada anti-angiogénica, una vez que se muestra que es efectiva en cualquier sistema modelo aceptable, para tratar la variedad completa de enfermedades y trastornos relacionados con la angiogénesis.

Los métodos y usos de la presente invención se proponen de manera particular para el uso en animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquier forma de tumor vascularizado; degeneración macular, incluyendo degeneración macular relacionada a la edad; artritis, incluyendo artritis reumatoide; aterosclerosis y placas ateroscleróticas; retinopatía diabética y otras retinopatías; hiperplasias de tiroides,

incluyendo enfermedad de Grave; hemangioma; glaucoma neovascular; y psoriasis.

Los métodos y usos de la invención se proponen además para el tratamiento de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, y restenosis vascular, incluyendo restenosis después de angioplastia. Otros objetivos propuestos de los métodos terapéuticos y usos son animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de, desarrollar angiofibroma, dermatitis, endometriosis, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, enfermedades y trastornos inflamatorios, granuloma piogénico, escleroderma, sinovitis, tracoma y adhesiones vasculares.

Como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,712,291 y 6,524,583, cada una incorporada en la presente específicamente como referencia, cada uno de los grupos anteriores de tratamiento algo preferidos no son de ninguna manera exhaustivos de los tipos de condiciones que se van a tratar por la presente invención. Las patentes de los Estados Unidos números 5,712,291 y 6,524,583, se incorporan cada una en la presente como referencia para ciertos propósitos específicos, incluyendo el propósito de identificar varias condiciones diferentes que se pueden tratar de manera efectiva por un producto terapéutico anti-angiogénico; para el propósito de mostrar que el tratamiento de todas las enfermedades angiogénicas representa un concepto unificado, una vez que se ha descrito y reivindicado una categoría definida de

compuestos inhibidores de angiogénesis (en el presente caso, anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención, y el propósito de mostrar que el tratamiento de todas las enfermedades angiogénicas se permite por los datos de sólo un sistema modelo único.

En aspectos aún adicionales, y como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,712,291 y 6,524,583, cada una incorporada en la presente como referencia, los métodos y usos de la presente invención se proponen para el tratamiento de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, proliferación anormal de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Bechets, tumores transportados por sangre, enfermedad obstructiva carótida, quemaduras químicas, neovascularización coroidal, inflamación crónica, desprendimiento retinal crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, erosión por lentes de contacto, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidérmica, úlceras fungoideas, infección por Herpes simplex, infecciones por Herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración de lípidos, enfermedad de Lyme, queratolisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones Micobacterianas diferentes de lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, picaduras ópticas, síndrome de Osler-Weber (Osler-Weber-Rendu, osteoartritis, enfermedad de Pagets, pars planitis,

penfigoide, filectenulosis, poliarteritis, complicaciones post-láser, infecciones por protozoarios, pseudoxantoma elástica, queratitis sicca de pterigio, queratotomía radial, neovascularización retinal, retinopatía de premadurez, fibroplasias retrolentales, sarcoide, escleritis, anemia de células falsiformes, síndrome de Sogrens, tumores sólidos, enfermedad de Stargarts, enfermedad de Steven Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, trauma, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rabdomiosarcoma, colitis ulcerativa, oclusión de venas, deficiencia de Vitamina A y sarcoidosis de Wegeners.

La presente invención proporciona además métodos y usos para el tratamiento de animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, artritis, en común con el tratamiento de artritis usando agentes inmunológicos descritos en la patente de los Estados Unidos número 5,753,230, incorporada específicamente en la presente como referencia. La patente de los Estados Unidos número 5,972,922 también se incorpora específicamente en la presente como referencia para ejemplificar aún adicionalmente la aplicación de estrategias anti-angiogénicas al tratamiento de angiogénesis indeseada, asociada con diabetes, enfermedades parásitas, curación anormal de heridas, hipertrofia después de cirugía, quemaduras, lesión o trauma, inhibición de crecimiento de cabello, inhibición de ovulación y formación de cuerpo

amarillo, inhibición de implantación e inhibición de desarrollo de embrión en el útero. Todas las condiciones anteriores por lo tanto se contemplan por el tratamiento por los métodos y usos de la presente invención.

La patente de los Estados Unidos número 5,639,757 se incorpora además específicamente en la presente como referencia para ejemplificar el uso de estrategias anti-angiogénicas al tratamiento general de rechazo de injerto. El tratamiento de inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, efusión pericardiaca, tal como aquella asociada con pericarditis, y efusión pleural usando estrategias anti-angiogénicas con base en la inhibición de VEGF, se describe en WO 98/45331, incorporada específicamente en la presente como referencia. Por lo tanto, se contemplan animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquiera de las condiciones anteriores, para el tratamiento por los métodos y usos de la presente invención.

Como se describe en la WO 98/16551, incorporada específicamente en la presente como referencia, las moléculas biológicas que antagonizan la función de VEGF también son adecuadas para el uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable. Por consiguiente, los anticuerpos antagonizantes de VEGF, los métodos y usos de la presente invención, son aplicables al tratamiento de animales y pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar, enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable, por ejemplo, edema asociado con

tumores cerebrales, ascitis asociada con malignidades, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericardiaca y efusión pleural y similares.

Aunque se permite el tratamiento de todas las enfermedades anteriores dentro de la presente invención unificada, un aspecto particularmente preferido de los métodos y usos de la presente invención es la aplicación de terapia anti-angiogénica a animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, un tumor sólido vascularizado, un tumor metastático o metástasis de un tumor primario.

Se proporcionan además métodos para, y usos para, inhibir la angiogénesis inducida en VEGF, y de manera preferente, ejercer efecto anti-tumoral mejorado o anti-tumor sin inhibir de manera significativa la estimulación de osteoclastos o condroclastos de VEGF. Los métodos comprenden en general poner en contacto un tejido, ambiente tumoral o población de vasos angiogénicos que contienen células endoteliales vasculares y al menos uno de macrófagos, osteoclastos o condroclastos, con una composición que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, bajo condiciones efectivas para inhibir la angiogénesis inducida por VEGF, y para ejercer un efecto anti-tumor o anti-tumor mejorado sin inhibir de manera significativa la estimulación de osteoclastos o condroclastos de VEGF.

La presente invención proporciona de esta manera adicionalmente métodos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, que comprende administrar a un animal o paciente con esta enfermedad o cáncer una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una primera composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo anti-VEGF.

Además, los métodos y usos de la invención incluyen métodos y usos para inhibir la linfangiogénesis, que comprende poner en contacto un tejido que comprende, o una población de, vasos linfáticos ("linfáticos"), particularmente, linfáticos expuestos a o potencialmente expuestos a VEGF, con una composición anti-angiogénica que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, bajo condiciones efectivas para inhibir la linfangiogénesis.

Donde se mantienen *ex vivo* poblaciones de linfáticos, la presente invención tiene utilidad en programas de descubrimiento de fármacos. Donde la población de linfáticos está localizada dentro de un animal o paciente, la composición de la invención se administra al animal como una forma de terapia.

En términos para inhibir la linfangiogénesis, las "cantidades biológicamente efectivas" son cantidades de

anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención, efectivos para inhibir linfangiogénesis inducida por VEGF, es decir, linfangiogénesis estimulada por VEGF-A inducida por VEGFR2. De manera preferente, la linfangiogénesis inducida por VEGF se inducirá sin inhibir de manera significativa los eventos estimulados por VEGFR1, tal como estimulación de osteoclastos o condroclastos.

La invención incluye de esta manera métodos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con linfangiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con linfangiogénesis, que comprende administrar a un animal o paciente con esta enfermedad o cáncer una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una primera composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo anti-VEGF.

Un aspecto aún adicional de la invención proporciona el uso de los anticuerpos humanos de la invención o un fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo en la elaboración de una composición o medicamento para el uso en terapia, formación de imágenes o diagnóstico.

Un aspecto aún adicional proporciona los anticuerpos humanos de la invención o un fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo para el uso en terapia, diagnosis o formación de imágenes.

Además, la invención proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos humanos de la invención o un

fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo con uno o más excipientes, portadores, diluyentes, amortiguadores o estabilizadores farmacéuticamente aceptables.

Los métodos *in vivo* como se describen en la presente se llevan a cabo en general en un mamífero. Se puede tratar cualquier mamífero, por ejemplo humanos y cualquier ganado, animal doméstico o de laboratorio. Los ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, ovejas, conejos, vacas y monos. De manera preferente, sin embargo, el mamífero es un humano.

De esta manera, el término "animal" o "paciente" como se usa en la presente incluye cualquier mamífero, por ejemplo humanos y cualquier animal de ganado, doméstico o de laboratorio. Los ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, ovejas, conejos, vacas y monos. De manera preferente, sin embargo, el animal o paciente es un sujeto humano.

Esta invención enlaza tanto métodos anti-angiogénicos que usan anticuerpos no conjugados o desnudos y fragmentos de los mismos, y métodos de selección de objetivos vasculares usando inmunoconjugados en los cuales un anticuerpo humano de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une de manera operativa a un agente terapéutico. A menos que se señale específicamente de otro modo o se haga claro en términos científicos, los términos "anticuerpo y fragmento del mismo", como se usa en la presente, por lo tanto significan un anticuerpo humano "no conjugado o desnudo", o fragmento, que no está unido a otro

agente, particularmente un agente terapéutico o de diagnóstico. Estas definiciones no excluyen modificaciones del anticuerpo, tal como, a manera sólo de ejemplo, modificaciones para mejorar la vida media biológica, afinidad, avidez u otras propiedades del anticuerpo, o combinaciones del anticuerpo con otros efectores.

Los métodos de tratamiento anti-angiogénicos y usos de la invención también abarcan el uso tanto de anticuerpos no conjugados como desnudos e inmunoconjugados. En los métodos de tratamiento anti-angiogénicos basados en inmunoconjugados, el anticuerpo humano de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une preferentemente de manera operativa a un segundo agente anti-angiogénico (el anticuerpo anti-VEGF mismo, que es el primer agente anti-angiogénico). Los agentes anti-angiogénicos unidos pueden ser aquellos que tienen un efecto anti-angiogénico directo o indirecto.

Los métodos de tratamiento anti-angiogénico y usos comprenden administrar a un animal o paciente con una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Igualmente, el anticuerpo administrado se puede asociar de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos para, y usos para, tratar cáncer

metastático comprenden administrar a un animal o paciente con cáncer metastático una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los métodos adicionales son aquellos en donde el anticuerpo administrado se puede asociar de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos para, y usos para, reducir la metástasis de un cáncer primario comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, a un animal o paciente que tiene, o se trató para, un cáncer primario. De manera similar, el anticuerpo administrado se puede asociar de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden además administrar a un animal o paciente con esta enfermedad, por ejemplo, un tumor vascularizado, al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para inhibir la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad o tumor vascularizado. Igualmente, el anticuerpo administrado se puede asociar de manera operativa con un

segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden además administrar a un animal o paciente con esta enfermedad o cáncer al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para inhibir la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis dentro de la enfermedad o sitio canceroso. El anticuerpo administrado se puede asociar de manera alteARNtiva operativamente con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, también comprenden administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo; en donde el anticuerpo anti-VEGF inhibe sustancialmente la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (Flt-1). Igualmente, el anticuerpo administrado se puede asociar de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos aún adicionales para, y usos para,

tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden administrar a un animal o paciente con esta enfermedad, cáncer o tumor vascularizado una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un primer anticuerpo anti-VEGF, humano, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo anti-VEGF inhibe sustancialmente la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (Flt-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad, cáncer o tumor vascularizado sin deteriorar de manera significativa los eventos mediados por VEGFR1 en el animal. El anticuerpo administrado también se puede hacer de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos adicionales para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden administrar a un animal o paciente con esta enfermedad, cáncer o tumor vascularizado una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; en donde el anticuerpo anti-VEGF inhibe de manera sustancial la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR1 (Flt-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad, cáncer o

tumor vascularizado, incluyendo la inhibición de los macrófagos que expresan VEGFR2 en el sitio de enfermedad, particularmente macrófagos infiltrantes de tumor, que expresan VEGFR2. El anticuerpo administrado también se puede asociar de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos aún adicionales para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprenden administrar a un animal o paciente con esta enfermedad, cáncer o tumor vascularizado, una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo anti-VEGF inhibe de manera sustancial la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR2 (KDR/Flk-1), sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF, VEGFR1 (Flt-1), inhibiendo de este modo la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad, cáncer o tumor vascularizado, sin deteriorar de manera significativa la actividad de osteoclastos y/o condroclastos en el animal. Igualmente, el anticuerpo administrado se puede hacer de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los métodos para, y usos para, tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, incluyendo todas las formas de cáncer asociadas con angiogénesis, comprende además administrar a un animal o paciente con esta enfermedad, por ejemplo, un tumor vascularizado, al menos

un primer anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no conjugado o desnudo, de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para inhibir la angiogénesis dentro del sitio de enfermedad o tumor vascularizado sin ejercer un efecto adverso significativo en el metabolismo óseo.

Los métodos de tratamiento anti-angiogénicos, anteriores, y usos anteriores, comprenderán en general la administración de la composición farmacéuticamente efectiva al animal o paciente de manera sistémica, tal como por inyección transdérmica, intramuscular, intravenosa y similar. Sin embargo, será aceptable cualquier ruta de administración que permita que el agente terapéutico se coloque en el sitio o sitios angiogénicos, incluyendo células endoteliales vasculares intratumorales o tumorales. Por lo tanto, otras rutas adecuadas de distribución o administración incluyen oral, rectal, nasal, tópica y vaginal. La patente de los Estados Unidos número 5,712,291, se incorpora en la presente específicamente como referencia para los propósitos de incluir la descripción adicional de las varias rutas de administración que se pueden incluir en unión con el tratamiento de una enfermedad o trastorno angiogénico.

Para los usos y métodos para el tratamiento de artritis, por ejemplo, se puede emplear administración intrasinovial, como se describe para otros agentes inmunológicos en la patente de los Estados Unidos número 5,753,230, incorporada específicamente en la presente como referencia. Para condiciones asociadas con el ojo, se

contemplan formulaciones y administración oftálmica.

"Administración", como se usa en la presente, significa la provisión o distribución del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 en cantidades y durante periodos de tiempo efectivos para ejercer efectos anti-angiogénicos y/o anti-tumorales. La administración pasiva de productos terapéuticos proteínicos se prefiere en general, en parte, por su simplicidad y reproducibilidad.

Sin embargo, el término "administración" se usa en la presente para referirse a cualquiera y todos los medios por los cuales los anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención se distribuyan o proporcionen de otro modo a la vasculatura tumoral. La "administración" incluye por lo tanto la provisión de células que producen el anticuerpo anti-VEGF humano bloqueador de VEGFR2 de la invención de una manera efectiva para dar por resultado la distribución al tumor. En estas modalidades, puede ser deseable formular o empacar las células en una membrana, estructura o dispositivo implantable, selectivamente permeable, en general uno que se pueda remover para que cese la terapia. El anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, exógeno, de la invención, aún se preferirá en general, puesto que esto representa un método no invasivo que permite que se monitorice y controle de manera cercana a la dosis.

Los métodos terapéuticos y usos de la invención también se extienden a la provisión de ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 de la invención de una manera efectiva para dar

por resultado su expresión en la vecindad del tumor o su localización al tumor. Se puede emplear cualquier técnica de terapia génica, tal como distribución de ADN desnudo, genes y vectores recombinantes, distribución basada en células, incluyendo manipulación *ex vivo* de células del paciente y similares.

En modalidades aún adicionales, la invención proporciona métodos para, y usos para, distribuir agentes terapéuticos o de diagnóstico, seleccionados a los vasos sanguíneos angiogénicos asociados con la enfermedad. Estas modalidades se usan de manera preferente para administrar o distribuir agentes terapéuticos o de diagnóstico seleccionados a tumor o vasculatura intratumoral o estroma, y comprende administrar a un animal o paciente que tiene un tumor vascularizado una cantidad biológicamente efectiva de una composición que comprende al menos un primer inmunoconjugado en el cual se une de manera operativa un agente de diagnóstico o terapéutico a un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

Aunque no se requiere que se entienda el mecanismo de acción que fundamenta los aspectos de selección de objetivo de la invención a fin de practicar estas modalidades, se cree que los anticuerpos de la invención distribuyen agentes unidos a la vasculatura angiogénica y tumoral en virtud de la unión a VEGF unido al VEGFR1 expresado en las mismas. Estos métodos y usos de la invención se refieren de esta manera a la distribución de agentes terapéuticos o de diagnóstico, seleccionados a los

vasos sanguíneos angiogénicos, vasculatura tumoral o intratumoral y comprenden administrar a un paciente o animal en necesidad de tratamiento una cantidad biológicamente efectiva de una composición que comprende un inmunoconjugado en el cual se une de manera operativa un agente de diagnóstico o terapéutico al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una manera efectiva para permitir la unión del anticuerpo al VEGF unido al VEGFR1 expresado, sobreexpresado o favorecido en la expresión en los vasos sanguíneos angiogénicos, vasculatura tumoral o intratumoral, distribuyendo o administrando de esta manera el agente terapéutico o de diagnóstico al VEGF-VEGFR1 en los vasos sanguíneos angiogénicos, vasculatura tumoral o intratumoral.

La distribución de agentes terapéuticos seleccionados a la vasculatura tumoral o intratumoral o estroma actúa para detener el flujo sanguíneo o específicamente para detener el flujo sanguíneo, en la vasculatura tumoral; para destruir, o específicamente para destruir la vasculatura tumoral; y para inducir necrosis, o necrosis específica en un tumor. Estos métodos y usos de esta manera se pueden resumir como métodos para tratar un animal o paciente que tienen un tumor vascularizado, que comprende administrar al animal o paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humano anti-

VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, operativamente unido a un agente terapéutico.

Las "cantidades terapéuticamente efectivas" para el uso en la invención son cantidades de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o inmunoconjugados del mismos, efectivas para aniquilar de manera específica al menos una porción de las células endoteliales vasculares tumorales o intratumorales; para inducir de manera específica apoptosis en al menos una porción de las células endoteliales vasculares tumorales o intratumorales; para promover de manera específica la coagulación en al menos una porción de los vasos sanguíneos tumorales o intratumorales; para ocluir de manera específica o destruir al menos una porción de los vasos transportadores de sangre del tumor; para inducir de manera específica necrosis en al menos una porción de un tumor; y/o inducir regresión o remisión tumoral en la administración a animales o pacientes seleccionados. Estos efectos se logran en tanto que hay o poca o ninguna unión a, o poca o ninguna aniquilación de, células endoteliales vasculares en tejidos saludables normales; poca o ninguna coagulación en, oclusión o destrucción de vasos sanguíneos en tejidos normales, saludables; y que ejerciendo efectos secundarios insignificantes o manejables en tejidos saludables normales del animal o paciente.

Los términos "preferencialmente" y "específicamente", como se usa en la presente en el contexto de promover la coagulación en, o destruir, la

vasculatura tumoral, y/o en el contexto de unirse a estroma tumoral y/o provocar necrosis tumoral, significa de esta manera que el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención o inmunoconjugados del mismo funciona para lograr unión estromal, coagulación, destrucción y/o necrosis tumoral que se confina sustancialmente al estroma tumoral, vasculatura y sitio tumoral, y no se extiende de manera sustancial para provocar coagulación, destrucción y/o necrosis de tejido en tejidos saludables normales del animal o sujeto. La estructura y función de células saludables y tejidos saludables por lo tanto se mantiene sustancialmente sin deterioro por la práctica de la invención.

Aunque los anticuerpos de la invención distribuyen de manera efectiva agentes a vasculatura angiogénica y tumoral por la unión a VEGF en asociación con VEGFR1, otros métodos y usos superan con base en la distribución de un agente terapéutico a estroma tumoral, en donde ejerce un efecto terapéutico en los vasos cercanos. Estos métodos y usos comprenden administrar a un animal o paciente con u tumor vascularizado un inmunoconjugado que comprende un agente terapéutico unido de manera operativa al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para unir el inmunoconjugado al VEGF no unido a receptor dentro del estroma tumoral.

Estos métodos y usos comprenden administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado un

inmunoconjugado que comprende un agente terapéutico unido operativamente al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para colocar el inmunoconjugado dentro del estroma tumoral tal que el agente terapéutico unido ejerza un efecto anti-tumoral en la vasculatura tumoral circundante y/o células tumorales.

Los anticuerpos y composiciones, así como los métodos y usos, de la invención se extienden de esta manera composiciones que comprenden anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 que comprenden al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, operativamente unido a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico, de manera más particular, un primer agente terapéutico "distinto o exógeno". Este respecto, el "anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2" puede ser llamado por sí mismo un "primer agente terapéutico". Por consiguiente, cualquier agente terapéutico unido se puede llamar un primer "agente terapéutico distinto o exógeno", significando que también es un agente terapéutico, pero distinto de y unido al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2. La terminología equivalente para estos conjugados es para describir al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como que está operativamente unido a al menos un "segundo, distinto" agente terapéutico o de

diagnóstico.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención o conjugados terapéuticos se enlazan de manera preferente a uno o más agentes radioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-tubulina, agentes anti-celulares o citotóxicos, o coagulantes (factores de coagulación).

La invención proporciona de esta manera una variedad de anticuerpos conjugados y fragmentos de los mismos en los cuales se une de manera operativa el anticuerpo humano a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico. El término "inmunoconjugado" se usa de manera amplia para definir la asociación operativa del anticuerpo con otra agente efectivo y no se propone para referirse solo a algún tipo de asociación operativa, y no se limita de manera particular a "conjugación" químicas. Las proteínas de fusión recombinante se contemplan de manera particular. En tanto que el agente de distribución o selección de objetivo es capaz de unirse al objetivo y el agente terapéutico o de diagnóstico es suficientemente funcional en la distribución, será adecuado el modo de unión.

La unión de los agentes mediante porciones de carbohidrato en anticuerpos también se contempla. La glicosilación, tanto O-enlazada como N-enlazada se presenta de manera natural en los anticuerpos. Se pueden modificar anticuerpos recombinantes para recrear o crear sitos adicionales de glicosilación, si se desea, que se logra simplemente al crear por ingeniería las secuencias

apropiadas de aminoácidos (tal como Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser, o Thr) en la secuencia primaria del anticuerpo.

Los agentes actualmente preferidos para el uso en el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o conjugados terapéuticos de la invención y métodos y usos relacionados son aquellos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo y/o aquellos seleccionados para un tipo particular de tumor o paciente particular. Los "agentes terapéuticos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo" incluyen agentes radioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis y fármacos anti-tubulina, cualquiera o cualesquiera de los cuales se prefiere para el uso con la presente.

La unión o asociación de los agentes preferidos con los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención da "inmunoconjugados", en donde estos inmunoconjugados frecuentemente tienen propiedades antitumorales mejoradas y aún sinérgicas. Los agentes anti-angiogénicos actualmente preferidos para el uso de esta manera son angiostatina, endostatina, cualquiera de las angiopoyetinas, vasculostatina, canstatina y maspina. Los fármacos anti-tubulina actualmente preferidos incluyen colquicina, taxol, vinblastina, vincristina, vindescina y uno o más de combretastatinas.

El uso de agentes anti-celulares y citotóxicos da por resultado "inmunotoxinas" de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención, en tanto que el uso de factores de coagulación da por resultado el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 o

"coaguligandos" de la invención. El uso de al menos dos agentes terapéuticos también se contempla, tal como combinaciones de uno o más agentes radioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-tubulina, agentes anti-celulares y citotóxicos y factores de coagulación.

En ciertas aplicaciones, los productos terapéuticos de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención se unirán de manera operativa a agentes citotóxicos, citostáticos o anti-celulares de otro modo que tienen la capacidad de aniquilar o suprimir el crecimiento o división celular de células endoteliales. Los agentes anti-celulares adecuados incluyen agentes quimioterapéuticos, así como citotoxinas y agentes citostáticos. Los agentes citostáticos son en general aquellos que perturban el ciclo celular natural de una célula objetivo, preferentemente de modo que la célula se salga del ciclo celular.

Los agentes terapéuticos de ejemplo incluyen: esteroides; citocinas; anti-metabolitos, tal como citosina-arabinosido, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides de vinca per vinca; antibióticos; demecolcina; etoposido; mitramicina; y agentes alquilantes anti-tumorales, tal como clorambucilo o melfalano. En realidad, se puede usar cualquiera de los agentes descritos en la presente en la Tabla C. Ciertos agentes anti-celulares preferidos son inhibidores de la síntesis de ADN, tal como daunorubicina, doxorubicinaa/adriamicina, y similares. En conjunto,

taxol/paclitaxel, docetaxel, cisplatina, gemcitabina, una combretastatina y doxorubicinaa/adriamicina son agentes anti-cáncer actualmente preferidos.

De las citocinas y quimiocinas, los agentes actualmente preferidos son IL-2, IL-12, TNF-α, interferón-α (IFN-α), IFN-β, IFN-γ, y LEC (quimiocina expresada en hígado). Los inhibidores de ATPasa tipo V también son actualmente preferidos, tal como salicilihalamida, concanamicina o bafilomicina, como lo son los inhibidores de síntesis de proteínas tal como psimberina, pederina, irciniastatina A.

En ciertas aplicaciones terapéuticas, se formarán porciones de toxinas, debido a la mucho mayor capacidad de la mayoría de las toxinas para distribuir un efecto de aniquilación celular, en comparación a otros agentes potenciales. Por lo tanto, ciertos agentes anti-celulares preferidos para las construcciones de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención son toxinas distribuidas en planta, hongos, o bacterias. Las toxinas de ejemplo incluyen epipodofiltoxinas; endotoxina bacteriana o la porción de lípido A de endotoxina bacteriana; proteínas inactivadoras de ribosomas, tal como saporina o gelonina; a-sarcina; aspergillina; restrictocina; ribonucleasas, tal como ribonucleasa placentaria; toxina de difteria y exotoxina de pseudomonas. Los ejemplos actualmente preferidos son ricina, gelonina, abrina, difteria, pseudomonas y toxinas de pertusis.

Ciertas toxinas preferidas son las toxinas de cadena A, tal como cadena de ricina A. La porción de toxina

más preferida frecuentemente es cadena de ricina A que se ha tratado para modificar o remover residuos de carbohidrato, llamada cadena A "desglicosiladas" (dgA). La cadena de ricina A desglicosilada se prefiere debido a su potencia extrema vida media más prolongada y debido a que es económicamente factible de elaborar a un grado y escala clínica. También se puede usar cadena de ricina A recombinante y/o truncada.

Para la selección de objetivos tumorales y para el tratamiento con inmunotoxinas, se incorporan específicamente en la presente las siguientes patentes por referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a agentes anti-celulares y citotóxicos: patentes de los Estados Unidos Nos. 6,004,554; 5,855,866; 5,965,132; 5,776,427; 5,863,538; 5,660,827 y 6,051,230.

El anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la presente invención se pueden enlazar a un fármaco anti-tubulina. Los "fármacos anti-tubulina", como se usa en la presente, significan cualquier agente, fármaco, profármaco o combinación de los mismos que inhiben la mitosis celular, preferentemente al inhibir directa o indirectamente las actividades de la tubulina necesarias para la mitosis celular, preferentemente la polimerización o despolimerización de tubulina

Los fármacos anti-tubulina actualmente preferidos para el uso con la presente son colquicina; taxanos, tal como taxol, docetaxel y paclitaxel; alcaloides de vinca per vinca, tal como vinblastina, vincristina y vindescina; y

combretastatinas. Las combretastatinas de ejemplo son combretastatina A, B y/o D, incluyendo A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3, B-4, D-1 y D-2 y formas de profármaco de las mismas

Los productos terapéuticos del anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, pueden comprender un componente que sea capaz de promover la coagulación, es decir, un coagulante. Aquí, el anticuerpo que se dirige al objetivo puede ser directa o indirectamente, por ejemplo, mediante otro anticuerpo, estar enlazado a un factor que estimula directo o indirectamente la coagulación.

Los factores preferidos de coagulación para estos usos son Factor de Tejido (TF) y derivados de TF, tal como TF truncado (tTF), TF dimérico, trimérico, polimérico /multimérico, y TF multante deficiente de la capacidad activar el factor VII. Otros factores adecuados de coagulación incluyen coagulantes dependientes de vitamina K tal como el Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa y Factor X/Xa; factores de coagulación dependientes de vitamina K que carecen de la modificación Gla; activador de Factor X de veneno de víbora de Russell; compuestos activadores de plaquetas, tal como tromboxano $A_2$ y tromboxano $A_2$ sintasa; e inhibidores de fibrinolisis, tal como α2-antiplasmina. En conjunto, se prefiere actualmente el factor de tejido truncado (tTF).

La selección de objetivo tumorales y el tratamiento con coaguligandos se describe en las siguientes patentes, cada una de las cuales se incorpora

específicamente en la presente como referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a los coaguligandos y factores de coagulación: patentes de los Estados Unidos Nos. 5,855,866; 5,965,132; 6,093,399; 6,004,555; 5,877,289; y 6,036,955.

La preparación de inmunoconjugados e inmunotoxinas es bien conocida en general en la técnica (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos No. 4,340,535). Cada una de las siguientes patentes se incorpora adicionalmente en la presente como referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a la generación de inmunotoxinas, purificación y uso de las mismas: Patente de los Estados Unidos Nos. 6,004,554; 5,855,866; 5,965,132; 5,776,427; 5,863,538; 5,660,827 y 6,051,230.

En la preparación de inmunoconjugados e inmunotoxinas, se pueden lograr ventajas a través del uso de ciertos ligadores. Por ejemplo, frecuentemente se prefieren ligadores que contienen un enlace de disulfuro que estás estéricamente "impedido", debido a su mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo de este modo la liberación de la porción de toxina antes de la unión en el sitio de acción. En general, se desea tener un conjugado que permanecerá intacto bajo condiciones encontradas en cualquier parte del cuerpo excepto el sitio propuesto de acción, punto en el cual se desea que el conjugado tenga buenas características de "liberación".

Dependiendo del compuesto específico de toxina, usado, puede ser necesario proporcionar un separador

peptídico que una de manera operativa el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención y el compuesto de toxina, en donde el separador peptídico es capaz de plegarse en una estructura de asa unida a disulfuro. La escisión proteolítica dentro del asa entonces producirá un polipéptido heterodimérico en donde el anticuerpo y el compuesto de toxina se enlazan por solo un enlace único de disulfuro.

Cuando se utilizan ciertos compuestos diferentes de toxina, se puede proporcionar un separador peptídico no escindible para unir de manera operativa el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención y el compuesto de toxina. Las toxinas que se pueden usar en unión con los separadores peptídicos no escindibles son aquellas que se pueden convertir por sí mismas por escisión proteolítica, en una forma citotóxica unida a disulfuro. Un ejemplo de este compuesto de toxina es un compuesto de hexotoxina de *Pseudomonas*.

Una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros farmacológicos también se pueden conjugar de manera exitosa a los productos terapéuticos del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención. Los agentes antineoplásticos de ejemplo que se han conjugado a los anticuerpos incluyen doxorubicina, daunomicina, metotrexato y vinblastina. Además, la unió de otros agentes tal como neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α-amanitina se han descrito (ver Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,660,827; 5,855,866; y 5,965,132; cada una incorporada en la presente).

También se práctica fácilmente la preparación de coaguligandos. La asociación operable de uno o más factores de coagulación con un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención puede ser un enlace directo, tal como aquellos descritos anteriormente para las inmunotoxinas. De manera alteARNtiva, la asociación operativa puede ser una unión indirecta, tal como donde el anticuerpo se una de manera operativa a una segunda región de unión, preferentemente un anticuerpo o región de unión a antígeno de un anticuerpo, que se une al factor de coagulación. El factor de coagulación se debe unir al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención en un sitio distinto de su sitio funcional de coagulación, particularmente donde se use un enlace covalente para unir las moléculas.

Los coaguligandos indirectamente enlazados frecuentemente se basan en anticuerpos biespecíficos. También es bien conocida la técnica la preparación de anticuerpos biespecíficos. Un método de preparación comprende la preparación separada de anticuerpos que tienen especificidad para el componente tumoral buscado, por una parte y el agente coagulador por otra parte. Los fragmentos peptídicos $F(ab'\gamma)_2$ de los dos anticuerpos elegidos entonces se generan seguido por reducción de cada uno para proporcionar fragmentos Fab'γsH separados. Los grupos SH en uno de los dos compañeros que se van a acoplar entonces se alquilan con un reactivo reticulador, tal como o-fenilendimaleimida, para proporcionar grupos maleimida libres en un compañero. Este compañero entonces se puede

conjugar al otro por medio de un enlace de tioéter, para el heteroconjugado $F(ab'\gamma)_2$ deseado (Glennie et al, 1987). También se pueden llevar a cabo otros planteamientos, tal como reticulación con SPDP o proteína A.

En la preparación de inmunoconjugados, inmunotoxinas y coaguligandos, se puede emplear expresión recombinante. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, elegido, de la invención, y el agente terapéutico, toxina o coagulante, se unen en cuadro en un vector de expresión. De esta manera la expresión recombinante da por resultado la traducción del ácido nucleico para producir el inmunoconjugado deseado. Los reticuladores químicos y los puentes de avidina:biotina también pueden unir los agentes terapéuticos al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención.

Las siguientes patentes incorporan cada una en al presente como referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a la preparación, purificación y uso de coaguligandos, incluyendo coaguligandos de anticuerpos biespecíficos: Patentes de los Estados Unidos No. 5,855,866; 5,965,132; 6,093,399; 6,004,555; 5,877,289; y 6,036,955.

Los inmunoconjugados con agentes radioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-tubulina, toxinas y coagulantes, ya sea preparados por conjugación química o expresión recombinante, pueden emplear una unión

biológicamente liberable y/o un separador o ligador selectivamente escindible. Estas composiciones son preferentemente estables de manera razonable durante la circulación y de manera preferente o especialmente se liberan en la distribución al sitio de enfermedad o de tumor.

Ciertos ejemplos preferidos son separadores sensibles a ácidos, donde se contemplan de manera particular anticuerpos humanos Anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención enlazados a colquicina o doxorubicina. Otros ejemplos preferidos son ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para peptidasas y/o proteinasas que están específica o preferencialmente presentes o activos dentro de un sitio de enfermedad, tal como un ambiente tumoral. La distribución del inmunoconjugado al sito de enfermedad o tumor da por resultado la escisión y la liberación relativamente específica del factor de coagulación.

Los ligadores peptídicos que incluyen un sito de escisión para urocinasa, pro-urocinasa, plásmino, plasminogeno, TGFβ, estafilocinasa, Trombina, Factor IXa, Factor Xa o metaloproteinasa (MMP), tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, son particularmente preferidos, como se describe y posibilita por las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,877,289 y 6,342,221, cada una incorporada en la presente como referencia para estos propósitos.

El anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención también se puede derivatizar para

introducir grupos funcionales que permiten la unión de los agentes terapéutico a través de un enlace biológicamente liberable. El anticuerpo de selección objetivo de esta manera se puede derivatizar para introducir cadenas laterales que terminan en grupos hidrazida, hidrazina, amina primarios o amina secundarios. Los agentes terapéuticos se pueden conjugar a través de un enlace de base de Schiff, un enlace de hidrazona o acil-hidrazona o un ligador de hidrazida (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,474,765 y 5,762,918).

Ya sea que son base principalmente en lo anti-angiogénico o en la selección de objetivos vasculares, las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos y de diagnóstico. En términos de agentes biológicos, preferentemente agentes terapéuticos o de diagnóstico, para el uso "en combinación" con un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de acuerdo con la presente invención, el término "en combinación" se usa de manera abreviada para cubrir una variedad de modalidades. La terminología "en combinación", a menos que se señale de manera específica de otro modo o se haga claro de la terminología científica, aplica de esta manera a varios formatos de composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, métodos y primeros y segundos usos médicos.

Las modalidades "combinadas" de la invención incluyen de esta manera, por ejemplo, donde el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención es un anticuerpo desnudo y se usa en combinación con un agente o

agente terapéutico que no está unido de manera operativa al mismo. En estos casos, el agente o agente terapéutico se puede usar en una forma no dirigida al objetivo o dirigida al objetivo. En la "forma no dirigida al objetivo", el agente, particularmente agentes terapéuticos, se usará en general de acuerdo a su uso normal en la técnica. En la "forma dirigida al objetivo", el agente se unirá en general de manera operativa a un anticuerpo distinto o región de selección de objetivo que distribuye el agente o agentes terapéuticos a un sitio de enfermedad angiogénica o tumor. El uso de estas formas dirigidas a objetivo de los agentes biológicos, tanto de diagnóstico como terapéuticos también es bastante normal en la técnica.

En otras modalidades "combinadas" de la invención, el anticuerpo anti-VEGF humano bloqueador de VEGFR2 de la invención es un inmunoconjugado en donde el anticuerpo se asocia por sí mismo de manera operativa o se combina con el agente o agente terapéutico. La unión operativa incluye todas las formas de unión directa e indirecta como se describe en la presente se conoce en la técnica.

Los usos "combinados", particularmente en términos del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención en combinación con agentes terapéuticos, también incluye composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, métodos, y primeros y segundos usos médicos en donde el agente terapéutico está en la forma de un profármaco. En estas modalidades, el componente activador capaz de convertir el

profármaco a la forma funcional del fármaco se puede asociar nuevamente de manera operativa con los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención.

En ciertas modalidades preferidas, las composiciones terapéuticas, combinaciones, productos farmacéuticos, cócteles, kits, métodos y primeros y segundos usos médicos serán "combinaciones de profármacos". Como se entenderá por los expertos en la técnica, el término "combinación de profármaco", a menos que se señale de otro modo, significa que el anticuerpo de la invención se une de manera operativa a un componente capaz de convertir el profármaco al fármaco activo, no que el anticuerpo se una al profármaco mismo. Sin embargo, no hay requisito de que las modalidades de profármaco de la invención se necesiten usar como combinaciones de profármaco. Por consiguiente, se pueden usar profármacos de cualquier manera que se usen en la técnica, incluyendo ADEPT, u otras formas.

De esta manera, donde se describan composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, métodos y primeros y segundos usos médicos, preferentemente en términos de agentes de diagnóstico, de mansera más preferentemente agentes terapéuticos, las combinaciones incluyen anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 que son anticuerpos desnudos e inmunoconjugados, y en donde la práctica de las modalidades *in vivo* de la invención comprende la administración anterior, simultánea o subsiguiente de los anticuerpos desnudos o

inmunoconjugado y el agente biológico, terapéutico o de diagnóstico; en tanto que, en alguna forma conjugada o no conjugada se logre la provisión completa de alguna forma del anticuerpo y alguna forma del agente biológico, terapéutico o de diagnóstico.

Las composiciones combinadas, métodos y usos particularmente preferidos de la invención son aquellos que incluyen anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención y endostatina (Patente de los Estados Unidos No. 5,854,205). Estos incluyen donde el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención es un anticuerpo desnudo o un inmunoconjugado; y cuando un inmunoconjugado, en donde el anticuerpo anti-VEGF humano bloqueador de VEGFR2 de la invención se enlaza endostatina, opcionalmente con angiostatina; en donde el método terapéutico combinado o uso comprende la administración anterior, simultánea o subsiguiente de endostatina, opcionalmente con angiostatina; en tanto que, en alguna forma conjugada o no conjugada, se logre la provisión completa del anticuerpo, endostatina y opcionalmente angiostatina. Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención asociados operativamente con colagenasa también se proporcionan, como la colagenasa cuando se distribuya de manera específica al tumor, producirá endostatina *in situ*, logrando beneficios similares.

Las explicaciones anteriores y otras de los efectos de la presente invención en tumores se hacen por simplicidad para explicar el modo combinado de operación,

tipo de agentes unidos y similar. Este planteamiento descriptivo no se debe interpretar como ya sea un entendimiento o un simplismo de las propiedades benéficas de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención. Por lo tanto, se entenderá que estos anticuerpos mismos tienen propiedades anti-angiogénicas y propiedades de neutralización de VEGF (tal como neutralización de la función de supervivencia de VEGF), inmunoconjugados de estos anticuerpos que mantendrán estas propiedades y se combinarán con las propiedades del agente unido; y además, que el efecto combinado del anticuerpo y cualquier agente unido se mejorará y/o aumentará de manera típica.

Por lo tanto, la invención proporciona composiciones, composiciones farmacéuticas, kits terapéuticos y cócteles medicinales que comprenden, opcionalmente en al menos una primera composición o recipiente, una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo anti-VEGF; y una cantidad biológicamente efectiva de al menos un segundo agente biológico, componente o sistema.

El "al menos un segundo agente biológico, componente o sistema" frecuentemente será un agente terapéutico o de diagnóstico, componente o sistema, pero puede no ser. Por ejemplo, el al menos un segundo agente biológico, componente o sistema puede comprender componentes para la modificación del anticuerpo y/o para la

unión de otros agentes al anticuerpo. Ciertos segundos agentes biológicos, componentes o sistemas preferidos son profármacos o componentes para hacer y usar profármacos, incluyendo componentes para elaborar el profármaco mismo y componentes para adaptar los anticuerpos de la invención para funcionar en esta modalidad de profármaco o ADEPT.

Donde se incluyen agentes terapéuticos o de diagnóstico como el al menos un segundo agente biológico, componente o sistema, estos productos terapéuticos y/o de diagnóstico serán típicamente aquellos para el uso en unión con enfermedades angiogénica. Estos agentes son aquellos adecuados para el uso en el tratamiento o diagnosis de una enfermedad o trastorno como se describe en cualquiera de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,712,291, 5,753,230, 5,972,922, 5,639,757, WO 98/45331 y WO 98/16551, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia de manera específica.

Donde la enfermedad que se va a tratar es cáncer, el "al menos un segundo agente anti-cáncer" se incluirá en el kit o cóctel terapéutico. El término "al menos un segundo agente anti-cáncer" se elige en referencia al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención que es el primer agente anti-cáncer. Los anticuerpos de la invención de esta manera se pueden combinar con agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citocinas, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis o inmunotoxinas anti-cáncer o coaguligandos.

Los "agentes quimioterapéuticos", como se usa en

la presente, se refieren a los fármacos o agentes quimioterapéuticos clásicos usados en el tratamiento de malignidades. Este término se usa por simplicidad, sin embargo el hecho que se puedan describir de manera técnica otros compuestos como agentes terapéuticos ya que ejercen un afecto anti-cáncer. Sin embargo, el "quimioterapéutico" tiene que tener un significado distinto en la técnica y se está usando de acuerdo a este significado normal. En la presente se describe varios agentes quimioterapéuticos de ejemplo, aquellos expertos en la técnica entenderá fácilmente los usos y dosis apropiadas de los agentes quimioterapéuticos, aunque las dosis se pueden reducir también cuando se usan en combinación con la presente invención.

Una nueva clase de fármacos que se puede llamar también "agentes quimioterapéuticos" son agentes que inducen apoptosis. También se puede usar cualquiera o cualesquiera de estos fármacos, incluyendo genes, vectores, construcciones antisentido y ribozimas, como sea apropiado, en unión con la presente invención. Los segundos agentes actualmente preferidos son agentes anti-angiogénicos, tal como angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina.

Otro agente anti-cáncer de ejemplo incluye, por ejemplo, neomicina, podofilotoxinas, TNF-$\alpha$, $\alpha_v\beta_3$-antagonistas, ionóforos de calcio, agentes inductores del flujo de calcio, y cualquier derivado o profármaco del mismo. Los fármacos anti-tubulina actualmente preferidos incluyen colquicina, taxol, vinblastina, vincristina,

vindescina, una combretastatina o un derivado o profármaco de los mismos.

Las inmunotoxinas o coaguligandos anti-cáncer son además agentes anti-cáncer apropiados. Las "inmunotoxinas o coaguligandos Anti-cáncer", o las construcciones de agente de selección de objetivo/agente terapéutico, se basan en agentes de selección de objetivo, incluyendo anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a un componente seleccionable como objetivo o accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, y que se une de manera operativa a un agente terapéutico, incluyendo agentes citotóxicos (inmunotoxinas) y factores de coagulación (coaguligandos). Un "componente seleccionable como objetivo o accesible" de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, es preferentemente un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizable en superficie, aunque también se pueden seleccionar como objetivo componentes liberados de células tumorales necróticas o de otro modo dañadas o células endoteliales vasculares, incluyendo antígenos de células tumorales citosólicas y/o nucleares.

Se pueden usar agentes de selección de objetivo de anticuerpo y no de anticuerpo, incluyendo factores de crecimiento, tal como VEGF y FGF; péptidos que contienen el tripéptido R-G-D, que se unen de manera específica a la vasculatura tumoral; y otros componentes de selección de objetivo tal como anexinas y ligandos relacionados.

La inmunotoxinas o coaguligandos anti-células tumorales pueden comprenden anticuerpos ejemplificados por

el grupo que consiste de anticuerpos llamados B3 (ATCC HB 10573), 260F9 (ATCC HB 8488), D612 (ATCC HB 9796) y KS 1/4, el anticuerpo KS 1/4 obtenido de una célula que comprende el vector pGKC2310 (NRRL B-18356) o el vector pG2A52 (NRRL B-18357).

Los agentes de selección de objetivo anti-células tumorales que comprenden un anticuerpo, o una región de unión a antígeno del mismo, que se unen a un componente intracelular que se libera de una célula tumoral necrótica, también se contemplan. De manera preferente, estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a antígenos intracelulares insolubles presentes en las células que se pueden inducir para que sean premiables, o en fantasmas celulares de sustancialmente todas las células neoplásticas y normales, pero que no están presentes ni accesibles en el exterior de las células vivas normales de un mamífero.

Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,019,368, 4,861,581 y 5,882,626, cada una emitida a Alan Epstein y colaboradores, se incorporan cada una de manera específica en la presente como referencia para los propósitos de describir aún adicionalmente y enseñar como elaborar y usar los anticuerpos específicos para antígenos intracelulares que van a llegar a ser accesibles de células malignas *in vivo*. Los anticuerpos descritos son suficientemente específicos a componentes celulares internos de células malignas mamíferas, pero no a componentes celulares externos. Los objetivos de ejemplo incluyen histonas, pero se contemplan todos los componentes

intracelulares específicamente liberados de las células tumorales necróticas.

En la administración a un animal o paciente con un tumor vascularizado, estos anticuerpos localizan las células malignas en virtud del hecho que los tumores vascularizados contienen de manera natural células tumorales necróticas, debido a los procesos de remodelado tumoral que se presentan *in vivo* y que provocan que al menos una porción de las células malignas lleguen a ser necróticas. Además, el uso de estos anticuerpos en combinación con otras terapias que mejoran la necrosis tumoral sirve para mejorar la efectividad de la terapia de selección de objetivo y la terapia subsecuente.

Estos tipos de anticuerpos de esta manera se pueden usara para asociar de manera directa o indirecta con angiopoyetinas y para administrar las angiopoyetinas a células malignas necróticas dentro de tumores vascularizados, como se describe en general en la presente.

También se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,019,368, 4,861,581 y 5,882,626, cada una incorporada en la presente como referencia, estos anticuerpos que se pueden usar en métodos combinados de diagnóstico (ver más adelante) y en métodos para medir la efectividad de terapias anti-tumorales. Estos métodos comprenden en general la preparación de administración de una versión marcada de los anticuerpos y la medición de la unión del anticuerpo marcado al objetivo del componente celular interno preferentemente unido dentro del tejido necrótico. Los métodos de este modo forman en imagen el

tejido necrótico, en donde una concentración localizada del anticuerpo es indicativa de la presencia de un tumor e indica fantasmas de células que se han aniquilado por la terapia anti-tumoral.

Las inmunotoxinas o coaguligandos anti-estroma tumoral comprenderán en general anticuerpos que se unen a un componente de tejido conectivo, un componente de membrana basal o un componente de plaquetas activado; como se ejemplifica por la unión a fibrina, RIBS o LIBS.

Las inmunotoxinas o coaguligandos anti-vasculatura tumoral pueden comprender ligandos, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen a un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie de los vasos transportadores de sangre, preferentemente los vasos sanguíneos intratumorales, de un tumor vascularizado. Estos anticuerpos incluyen aquellos que se unen a los componentes expresados en superficie de vasos sanguíneos intratumorales y un tumor vascularizado, incluyendo receptores de superficie celular de vasculatura intratumoral, tal como endoglina (anticuerpos TEC-4 y TEC-11), un receptor TGFβ, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un receptor de VEGF/VPF, un receptor de FGF, un TIE, $\alpha_v\beta_3$-integrina, pleyotropina, endosialina y proteínas de MHC Clase II. Los anticuerpos también pueden unirse a promotores inducible por citocinas o inducibles por coagulante de vasos sanguíneos intratumorales. Ciertos agentes preferidos se unirán a aminofosfolípidos, tal como fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina.

Otras inmunotoxinas o coaguligandos anti-vasculatura tumoral pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen a un ligando o factor de crecimiento que se une a un receptor de superficie celular de vasculatura intratumoral. Estos anticuerpos incluyen aquellos que se unen a VEGF/VPF (anticuerpos GV39 y GV97), FGF, TGFβ, un ligando que se une a un TIE, una isoforma de fibronectina asociada a tumor, factor de dispersión/factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor 4 de plaquetas (PF4), PDGF y TIMP. Los anticuerpos, o fragmentos los mismos, también pueden unirse a un complejo de ligandos:receptor o a un complejo de factor de crecimiento:receptor, pero no a ligando ni al factor de crecimiento, ni al receptor cuando el ligando o factor de crecimiento o el receptor no es un complejo de ligando:receptor o factor de crecimiento:receptor.

Las construcciones de anticuerpo anti-célula tumoral, anti-estroma tumoral o anti-vasculatura tumoral-agente terapéutico pueden comprender agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-tubulina, agentes citotóxicos tal como toxinas derivadas de planta, hongos o bacterias. Frecuentemente se preferirán la cadena de ricina A y la cadena de ricina A desglicosilada. Las construcciones de anticuerpo anti-célula tumoral, anti-estroma tumoral o anti-vasculatura tumoral-agente terapéutico pueden comprender coagulantes (factores de coagulación de acción directa e indirecta) o regiones de unión del segundo anticuerpo que se unen a factores de coagulación. La asociación operativa con el

factor de tejido o derivados de factor de tejido, tal como factor de tejido truncado, frecuentemente se prefieren.

En términos de composiciones, kits y/o medicamentos de la invención, las cantidades efectivas combinadas de los agentes terapéuticos pueden estar comprendidas dentro de un recipiente individual o un medio de recipiente, o comprendidos dentro de distintos recipientes o medios de recipiente. Los cócteles en general se mezclarán conjuntamente para uso combinado. Frecuentemente se preferirán agentes formulados para administración intravenosa. También se pueden incluir componentes de formación de imágenes. Los kits también pueden comprender instrucciones para el uso de al menos un primer anticuerpo y uno o más agentes biológicos diferentes incluidos.

Hablando en general, el al menos un segundo agente anti-cáncer se puede administrar al animal o paciente de manera sustancialmente simultánea con un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención; tal como de una composición farmacéutica individual o de dos composiciones farmacéuticas administradas íntimamente de manera conjunta.

De manera alteARNtiva, el al menos un segundo agente anti-cáncer se puede administrar al animal o paciente en un momento secuencial al administración del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención. "En un momento secuencial", como se usa en la presente, significa "escalonado", talque el al menos un segundo agente anti-cáncer se administra al animal o

paciente en un momento distinto a la administración del anticuerpo humano anti- VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención. En general, los dos agentes se administran en momentos separados de manera efectiva para permitir que los dos agentes ejerzan sus efectos terapéuticos respectivos, es decir, se administren a "intervalos de tiempo biológicamente efectivos". El al menos un segundo agente anti-cáncer se puede administrar al animal o paciente en un tiempo biológicamente efectivo antes del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o en un momento biológicamente efectivo subsiguiente a este producto terapéutico.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para tratar un animal o paciente con un tumor vascularizado, que comprende:

(a) someter al animal o paciente a un primer tratamiento que reduce de manera sustancial la carga tumoral; y

(b) administra de manera subsiguiente al menos un primera agente anti-angiogénico al animal o paciente en una cantidad efectiva para inhibir la metástasis de cualquier célula tumoral superviviente; en donde el primer agente anti-angiogénico es al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo; opcionalmente en donde el anticuerpo o fragmento se asocia de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

Los primeros tratamientos preferidos incluyen resección quirúrgica e intervención quimioterapéutica.

También se pueden usar anti-angiogénicos combinados.

Otros métodos de tratamiento para animales o pacientes con tumores vascularizados, comprende:

(a) administrar una construcción de primer anticuerpo-agente terapéutico al animal o paciente en una cantidad efectiva para inducir necrosis tumoral sustancial; en donde la construcción de primer anticuerpo-agente terapéutico comprende un agente terapéutico operativamente enlazado a un primer anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral; y

(b) administrar de manera subsiguiente un segundo anticuerpo al animal o paciente en una cantidad efectiva para inhibir la metástasis de cualquier célula tumoral superviviente; en donde el segundo anticuerpo es al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmentos de unión a antígeno del mismo; y además opcionalmente donde el anticuerpo o fragmento se asocia de manera operativa con un segundo agente anti-angiogénico.

En modalidades particularmente preferidas, los anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención se proporcionan para el uso en combinación con profármacos y ADEPT. En estas composiciones, combinación, productos farmacéuticos, kits, métodos y usos, el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención o fragmento del mismo se modificará para

proporcionar una capacidad convertidora o enzimática, o se asocia operativamente con, preferentemente se enlaza de manera covalente o se conjuga a, al menos un primer agente o enzima convertidora capaz de convertir al menos un profármaco a la forma activa del fármaco.

El anticuerpo enzimático o conjugado a enzima, o fragmento, se combinará con una formulación inicialmente separada del "profármaco". El profármaco será una forma inactiva o débilmente activa de un fármaco que es el que se convierte a la forma activa del fármaco en el contacto de la capacidad enzimática, función convertidora o enzima asociada con el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención.

Por consiguiente, se proporcionan kits que comprenden, preferentemente en composiciones y/o recipientes separados:

(a) una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo anti-VEGF humano bloqueador de VEGFR2 de la invención o fragmento del mismo, que tiene una función enzimática, preferentemente donde el anticuerpo o fragmento se asocian de manera operativa con, se enlaza de manera covalente o se conjuga a, al menos una primera enzima; y

(b) una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer profármaco sustancialmente inactivo que se convierte a un fármaco sustancialmente activo por la función enzimática de, o la enzima asociada con, enlazado a o conjugado al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o fragmento.

La presente invención proporciona además métodos y usos ventajosos que comprenden:

(a) administrar a un animal o paciente con un tumor vascularizado una cantidad biológicamente efectiva de al menos una primera composición farmacéutica que comprende al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento tiene una función enzimática, preferentemente en donde el anticuerpo o fragmento se asocia de manera operativa con, se enlaza covalentemente a, o se conjuga a, al menos una primera enzima; en donde el anticuerpo o fragmento se coloca en la vasculatura, vasculatura intratumoral o estroma del tumor vascularizado después de la administración; y

(b) administrar de manera subsiguiente al animal o paciente, después de un periodo efectivo de tiempo, una cantidad biológicamente efectiva de al menos una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un profármaco sustancialmente inactivo; en donde el profármaco se convierte a un fármaco sustancialmente activo por la función enzimática de, o enzima asociada con, enlazada a, o conjugada al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o fragmento, de la invención localizado dentro de la vasculatura, vasculatura intratumoral o estroma del tumor vascularizado.

En ciertas modalidades diferentes, los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención se pueden combinar con una o más agentes de diagnóstico, típicamente

agentes de diagnóstico para el uso en unión con enfermedades angiogénicas. De esta manera se incluyen dentro de la invención una variedad de composiciones, kits y métodos de diagnóstico.

Los aspectos aún adicionales son métodos de diagnóstico o formación de imágenes de un sujeto, que comprenden la administración de una cantidad apropiada de un anticuerpo humano u otra proteína de la invención como se define en la presente al sujeto y detectar la presencia y/o cantidad y/o la ubicación del anticuerpo u otra proteína de la invención en el sujeto.

Las enfermedades apropiadas que se van a formar en imágenes o a diagnosticar de acuerdo con los usos y métodos descritos anteriormente incluyen cualquier enfermedad asociada con angiogénesis como se describe en otra parte de la presente.

En una modalidad, la invención proporciona un método para diagnosticar una enfermedad asociada con angiogénesis en un mamífero, que comprende el paso de:

(a) poner en contacto una muestra de prueba tomada del mamífero con uno o más de los anticuerpos de la invención.

En una modalidad adicional, la invención proporciona un método para diagnosticar la enfermedad asociada con angiogénesis en un mamífero, que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto una muestra de prueba tomada del mamífero con uno o más de los anticuerpos de la invención;

(b) medir la presencia y/o cantidad y/o ubicación del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba; y opcionalmente

(c) comparar la presencia y/o cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba a un control.

En los métodos anteriores, el paso de poner en contacto se lleva a cabo bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno. Se pueden determinar fácilmente por la persona experta en la técnica las condiciones apropiadas.

En los métodos anteriores, se puede usar cualquier muestra apropiada de prueba, por ejemplo células, tejidos u órganos de biopsia sospechosos de estar afectados por la enfermedad o secciones histológicas.

En ciertos métodos anteriores, la presencia de cualquier cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba será indicativa de la presencia de la enfermedad. De manera preferente, para que se haga una diagnosis positiva, la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba es mayor que, preferentemente significativamente mayor que, la cantidad encontrada en una muestra apropiada de control. De manera más preferente, los niveles significativamente mayores son estadísticamente significativos, preferentemente con un valor de probabilidad de $<0.05$. Son bien conocidos los métodos apropiados para determinar el significado estadístico y se documentan en la técnica y se puede usar cualquiera de estos.

Las muestras apropiadas de control se pueden elegir fácilmente por una persona experto en la técnica, por ejemplo, en el caso de diagnosis de una enfermedad particular, un control apropiado sería una muestra de un sujeto que no tenga esa enfermedad. Los "valores" apropiados de control también se pueden determinar fácilmente sin correr una "muestra" de control en cada prueba, por ejemplo, por referencia a la variedad de sujetos normales conocidos en la técnica.

Para el uso en las aplicaciones de diagnóstico o formación de imágenes, los anticuerpos de la invención se pueden marcar con un marcador detectable tal como un radio-opaco o radioisótopo, tal como $^{3}H$, $^{14}C$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{123}I$, $^{125}I$, $^{131}I$; un emisor radioactivo (por ejemplo, emisores $\alpha$, $\beta$ o $\gamma$); un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano; un agente para formar imágenes; o un ión metálico; o una porción química tal como biotina que se puede desprender por la unión a una porción detectable, cognada, específica, por ejemplo, avidina/estreptavidina marcadas. Los métodos para unir una marca a una proteína de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se conocen en la técnica. Estos marcadores detectables permiten que se examine la presencia, cantidad o ubicación de los complejos de proteína de unión-antígeno en la muestra de prueba.

Los marcadores detectables preferidos para el uso

*in vivo* incluyen un compuesto detectable por rayos X, tal como bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II); un ión radioactivo, tal como cobre$^{67}$, galio$^{67}$, galio$^{68}$, indio$^{111}$, indio$^{113}$, yodo$^{123}$, yodo$^{125}$, yodo$^{131}$, mercurio$^{197}$, mercurio$^{203}$, renio$^{186}$, renio$^{188}$, rubidio$^{97}$, rubidio$^{103}$, tecnecio$^{99m}$ o itrio$^{90}$; un isotipo de resonancia-giro magnético nuclear, tal como cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III), holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II), neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

La invención también incluye agentes de diagnóstico o de formación de imágenes que comprenden los anticuerpos de la invención unidos a una marca que produce una señal detectable, de manera directa o indirecta. Las marcas apropiadas se describen en otra parte de la presente.

La invención incluye además kits que comprenden uno o más de los anticuerpos humanos o composiciones de la invención o una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos de la invención, o uno o más vectores de expresión recombinante que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención, o una o más células hospedadoras o virus que comprenden los vectores de expresión recombinante o secuencias de ácido nucleico de la invención. De manera preferente, los kits son para el uso en los métodos y usos como se describe en la presente, por ejemplo, los métodos terapéuticos, de diagnóstico o de formación de imágenes como se describe en la presente, o

son para el uso en los ensayos o métodos *in vitro* como se describe en la presente. El anticuerpo en estos kits puede ser preferentemente un conjugado de anticuerpo como se describe en otra parte de la presente, por ejemplo, se puede conjugar a una marca detectable o puede ser un inmunoconjugado. De manera preferente, los kits comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit, por ejemplo en la diagnosis. De manera preferente, los kits son para diagnosticar enfermedades asociadas con angiogénesis y comprenden opcionalmente instrucciones para el uso de los componentes del kit para diagnosticar estas enfermedades.

Los anticuerpos de la invención como se define en la presente también se pueden usar como herramientas moleculares para aplicaciones *in vitro* o *in vivo* y ensayos. Puesto que los anticuerpos tienen un sitio de unión a antígeno, estos pueden funcionar como miembros de pares específicos de unión y estas moléculas se pueden usar en cualquier ensayo donde se requiera el miembro particular del par de unión.

De esta manera, aspectos aún adicionales de la invención proporcionan un reactivo que comprende un anticuerpo de la invención como se define en la presente y el uso de estos anticuerpos como herramientas moleculares, por ejemplo en ensayos *in vitro* o *in vivo*.

En términos de diagnosis de cáncer y tratamiento, las composiciones y diagnóstico y formación de imágenes, kits y métodos de la presente invención incluyen diagnósticos *in vivo* e *in vitro*. por ejemplo, un tumor

vascularizado se puede formar en imagen usando una cantidad diagnósticamente efectiva de un componente de diagnóstico de tumor que comprende al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral, operativamente unido a un agente de diagnóstico de formación de imágenes *in vivo*.

La formación de imágenes tumorales se lleva a cabo preferentemente para proporcionar una imagen del estroma y/o vasculatura de un tumor vascularizado usando un componente de diagnóstico que comprende al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de vasculatura tumoral o estroma tumoral. Se puede emplear cualquier región de unión o anticuerpo deseado, tal como aquellos descritos anteriormente en términos de las construcciones terapéuticas. Se proporcionarán ciertas ventajas al usar un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, marcado de manera detectable, de la construcción de la invención, en donde la imagen formada será predictiva de los sitios de unión del producto terapéutico que se va a usar.

El diagnóstico tumoral *in vivo* con marca detectable, preferentemente un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, puede comprender un compuesto detectable por rayos X, tal como bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II); un ion radioactivo, tal como cobre$^{67}$, galio$^{67}$, galio$^{68}$, indio$^{111}$, indio$^{113}$, yodo$^{123}$, yodo$^{125}$, yodo$^{131}$, mercurio$^{197}$, mercurio$^{203}$, renio$^{186}$, renio$^{188}$, rubidio$^{97}$, rubidio$^{103}$, tecnecio$^{99m}$ o itrio$^{90}$; un isotipo de

resonancia-giro magnético nuclear, tal como cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III), holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II), neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

La pre-formación de imágenes antes del tratamiento tumoral se puede llevar a cabo al:

(a) administrar al animal o paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente de diagnóstico unido de manera operativa a al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral (de manera preferente) o estroma tumoral (de manera preferente), incluyendo agentes de diagnóstico operativamente unidos a una construcción de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención; y

(b) detectar de manera subsiguiente la primera región de unión marcada de manera detectable (o anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención) unida a las células tumorales, vasos sanguíneos tumorales (preferentemente) o estroma tumoral (de manera preferente); obteniendo de esta manera una imagen del tumor, vasculatura tumoral y/o estroma tumoral.

También se puede llevar a cabo el tratamiento de cáncer al:

(a) formar una imagen de un tumor vascularizado al administrar a un animal o paciente que tiene un tumor

vascularizado una cantidad diagnósticamente mínima de al menos un primer agente de unión tumoral detectablemente marcado, preferentemente una construcción de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, que comprende un agente de diagnóstico operativamente unido al agente de unión tumoral o un anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, formando de este modo una imagen detectable del tumor, vasculatura tumoral (preferentemente), o estroma tumoral (de manera preferente); y

(b) administrar de manera subsiguiente al mismo animal o paciente una cantidad terapéuticamente optimizada de al menos un primer anticuerpo humano desnudo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención o construcción de agente terapéutico-anticuerpo usando este anticuerpo, provocando de este modo un efecto anti-tumoral.

De esta manera se proporcionan formulaciones o medicamentos de tratamiento y formación de imágenes, que comprenden en general:

(a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de un agente de unión tumoral marcado de manera detectable, preferentemente una construcción de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, que comprende un agente detectable unido de manera operativa al agente de unión tumoral o anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención; y

(b) una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al

menos un anticuerpo humano desnudo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención o construcción de agente terapéutico-anticuerpo que usa este anticuerpo.

La invención también proporciona kits de diagnóstico *in vitro* que comprenden al menos una primera composición o composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un agente de diagnóstico que se asocia de manera operativa con al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmentos de unión a antígeno del mismo.

La invención proporciona aún además kits combinados en los cuales el agente de diagnóstico se propone para el uso fuera del cuerpo, preferentemente en unión con una prueba llevada a cabo en una muestra biológica obtenida de un animal o paciente. Como tal, la invención proporciona kits que comprenden, en general en al menos dos recipientes distintos, al menos una primera composición, composición farmacéutica o cóctel medicinal que comprende una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, o un fragmentos de unión a antígeno o inmunoconjugado de este anticuerpo anti-VEGF; y una cantidad biológicamente efectiva de al menos un agente de diagnóstico, componente o sistema de diagnóstico para el uso *in vitro*.

El "agente, componente o sistema de diagnóstico para el uso *in vitro*" será cualquier agente o combinación de agentes de diagnóstico que permitan la diagnosis de una

o más enfermedades que tienen un componente angiogénico. El diagnóstico *in vitro* incluye de esta manera aquellos adecuados para el uso en la generación de información de diagnóstico o pronóstico con relación a una enfermedad o trastorno como se describe en cualquiera de las patentes de los Estados Unidos números 5,712,291, 5,753,230, 5,972,922, 5,639,757, WO 98/45331 y WO 98/16551, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia.

En términos de diagnosis y tratamiento de cáncer, los productos de diagnóstico *in vitro* incluirán preferentemente un componente de diagnóstico que comprenden al menos una primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral (preferentemente) o estroma tumoral (de manera preferente) operativamente unida a un "agente detectable o indicador" directa o indirectamente detectable por una prueba de diagnóstico *in vitro*. Los "agentes detectables o indicadores" directamente detectables *in vitro* incluyen aquellos tal como radiomarcas y agentes indicadores detectables por inmunofluorescencia.

Los "agentes detectables o indicadores" detectables indirectamente *in vitro* incluyen aquellos que funcionan en unión con agentes exógenos adicionales, tal como enzimas detectables que producen un producto coloreado en contacto con un sustrato cromogénico. La detección indirecta *in vitro* también se extiende a componentes detectables o indicadores o sistemas que comprenden la primera región de unión que se une a un componente accesible de una célula tumoral, vasculatura tumoral

(preferentemente) o estroma tumoral (de manera preferente) en combinación con al menos un anticuerpo detector que tiene inmunoespecificidad para la primera región de unión. El "anticuerpo detector" es preferentemente un "anticuerpo secundario" que se une a un agente detectable directo o indirecto, tal como una radiomarca o enzima. De manera alteARNtiva, un "sistema de detección de anticuerpo secundario y terciario" se puede usar, incluyendo un primer anticuerpo detector que tiene inmunoespecificidad para la primera región de unión en combinación con un segundo anticuerpo detector que tiene inmunoespecificidad para el primer anticuerpo detector, el segundo anticuerpo detector que se une a un agente detectable directo o indirecto.

**Breve Descripción de las Figuras**

Las siguientes figuras forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a cualquiera o cualesquiera de estas figuras en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas en la presente.

Las Figuras 1A-1B muestran las secuencias de nucleótidos (figura 1A) y de aminoácidos (figura 1B) de la región variable de cadena pesada (VH) y ligera (VL) de una forma scFv del clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311). Se clonó scFv mediante el sitio Nco/NotI en pHOG21 (3.7 Kb). Los sitios de restricción usados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MIuI y NotI) están en cursivas y subrayados. La secuencia ligadora entre VH y VL está en

cursivas.

La Figura 2 el clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv que se une a VEGF. La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de ELISA para valorar la unión del clon EJ173/112-C11 (r84), su clon madre y un anticuerpo de control positivo (B9 murino) a VEGF-A colocado en placa. El clon EJ173/112-C11 (r84) mostró la más alta señal de unión y por lo tanto la mayor afinidad.

La Figura 3 muestra que el clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv compite de manera efectiva con el anticuerpo 2C3 para la unión a VEGF, que se muestra por los resultados de un ensayo de ELISA de competición. Puesto que el clon EJ173/112-C11 (r84) compite de manera efectiva con el anticuerpo 2C3 para la unión a VEGF, esto muestra que el clon EJ173/112-C11 (r84) se une a sustancialmente el mismo epítopo como el anticuerpo anti-VEGF 2C3 murino.

La Figura 4 muestra que el clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv se une tanto a VEGF murino como a VEGF humano.

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo Biacore usado para valorar la afinidad de unión de varios anticuerpos scFv a VEGF-A inmovilizado. Las curvas de unión se muestran en la Figura 5 donde se puede ver que la forma scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) tiene una notablemente mayor afinidad de unión que la forma de cadena individual del clon madre (m). Otras curvas mostradas se marcan r41, r68, r3 y r26.

La Figura 6 muestra que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) IgG inhibe la señalización celular

intracelular mediada por VEGF mediante VEGFR2, que se muestra por los resultados de un ensayo celular *in vivo* en donde se muestra que EJ173/112-C11 (r84) inhibe la fosforilación de Erk1/2.

La Figura 7 muestra que el clon EJ173/112-C11 (r84/PGN311) reconoce la isoforma 121 truncada de VEGF (VEGF121), que se muestra por los resultados de un ensayo de ELISA. (ScFV contra isoforma 121 de VEGF)

La Figura 8A y la Figura 8B muestran conjuntamente que r84/PGN311 bloquea de manera sustancial la interacción de VEGF con VEGFR2 pero no bloquea de manera sustancial la interacción de VEGF con VEGFR1. Se incubó VEGF-biotina en la presencia o ausencia de los anticuerpos indicados en las concavidades de una placa de ELISA que se cargó con VEGFR1 soluble (Figura 8A) o VEGFR2 (Figura 8B). La señal de VEGF solo (VEGF) o VEGF en la presencia del anticuerpo indicado se normalizó a VEGF solo (100 %). La media +/- SEM se muestra. N = 12 (4 placas idénticas con cada tratamiento realizado en triplicado). Una señal de menos de 50 % se considera inhibición sustancial y significante de la unión. Synagis es un anticuerpo humano anti-RSV usado como un control negativo. Para comparación, también se presentan los resultados con el anticuerpo Avastin (bevacizumab) (Presta et al., 1997), que muestra que Avastin bloquea de manera sustancial la interacción de VEGF tanto con VEGFR2 como con VEGFR1.

La Figura 9A y la Figura 9B muestran el vector de expresión de scFv. La Figura 9A muestra el vector de expresión de scFv pHOG21. ApR, gen de resistencia a

Ampicilina; ColE1, origen de replicación de ADN; fIIG, región intergénica de fago f1; c-myc, epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal 9E10; His6, seis residuos de histidina; pelB, péptido de señal de pectato-liasa bacteriana; P/O, operador de promotor lac tipo silvestre. La Figura 9B muestra las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 28) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de la región codificante C-terminal.

La Figura 10A, Figura 10B y Figura 10C muestran que los macrófagos asociados a tumor expresan VEGFR2. La Figura 10A muestra la co-localización de la tinción T014 (anticuerpo de VEGFR2) y F4/80 (marcador de macrófago) en secciones tumorales de animales tratados con control o tratados con 2C3. La Figura 10A muestra que 2C3 disminuye la infiltración de macrófagos. Sin embargo, tanto los grupos de control como con 2C3 demuestran la co-localización de VEGFR2 y marcadores de macrófagos. La Figura 10B muestra el número de células doblemente positivas para uno de tres diferentes marcadores de macrófago y VEGFR2. La Figura 10C usa dos diferentes anticuerpos a VEGFR2 para mostrar que los macrófagos peritoneales de animales que tienen tumor expresan VEGFR2.

La Figura 11 muestra que r84/PGN311 inhibe el crecimiento de tumores MDA-MB-231. La Figura 11 muestra resultados de un estudio que usa el modelo de tumor de cáncer de mama MDA-MB-231 *in vivo* (de ratón) y el efecto de r84, Avastin o solución salina (control) en el volumen tumoral. Se muestra el volumen tumoral medio +/- SEM. Los ratones tratados con Avastin y r84 tienen volúmenes

tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con control.

La Figura 12 muestra resultados del mismo estudio como se muestra en la Figura 11, excepto que la Figura 12 muestra la relación de peso tumoral/peso corporal para animales individuales en cada grupo. Ratones tratados con Avastin y r84/PGN311 tienen relaciones de peso tumoral/peso corporal que son significativamente más pequeñas que los animales tratados con control.

La Figura 13 muestra que r84/PGN311 inhibe el crecimiento de tumores A673. La Figura 13 muestra resultados de un estudio que usa el modelo de tumor A673 *in vivo* (de ratón) y el efecto de r84, 2C3 o un anticuerpo de control (Synagis - anti-RSV humano) en el volumen tumoral. Se muestra el volumen tumoral medio +/- SEM. Los ratones tratados con 2C3 y r84 tienen volúmenes tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con control. De esta manera 2C3 y r84 son efectivos en el control del crecimiento de tumores A673. (4Mc A637 subw)

La Figura 14 muestra que r84/PGN311 reduce de manera significativa la infiltración de macrófagos asociados a tumor. Se tomaron tumores de ratones con células tumorales MDA-MB-231 y se seccionaron y tiñeron con anticuerpos a un marcador de macrófagos (Mac-3). Tres tumores de los animales de control y tres tumores cada uno de los animales tratados con r84 y 2C3 se analizaron y se estudiaron 5 imágenes de cada tumor. La Figura 14 muestra que los tumores de animales tratados con r84 y 2C3 mostraron expresión significativamente reducida del

marcador de macrófagos Mac-3, y que r84 tiene un efecto más pronunciado que 2C3 ($p < 0.01$ para r84).

La Figura 15 muestra que r84/PGN311 reduce de manera significativa la densidad de microvasos en tumores en modelo de animal MDA-MB-231. Se tomaron tumores de ratones con células tumorales MDA-MB-231 y se seccionaron y tiñeron con anticuerpos a células endoteliales de ratón (MECA-32). Tres tumores de los animales de control y tres tumores cada uno de los animales tratados con r84 y 2C3 se analizaron y se estudiaron 5 imágenes de cada tumor. La Figura 15 muestra que los tumores de los animales tratados con r84 y 2C3 mostraron un número significativamente reducido de vasos sanguíneos/campo de alta potencia (MECA-32, $p < 0.0001$).

La Figura 16A y la Figura 16B muestran que r84/PGN311 bloquea de manera selectiva la ruta de VEGFR2. La Figura 16A muestra que r84/PGN311 inhibe la fosforilación estimulada por VEGF (+VEGF) de Erk1/2 (pERK1/2) y PLC-γ (pPLC-γ) en células que expresan VEGFR2 (HDMEC). El control positivo Avastin también inhibe la fosforilación estimulada por VEGF de Erk1/2 y PLC-γ. La Figura 16B muestra que r84/PGN311 no inhibe la fosforilación estimulada por VEGF de VEGFR1 en células que expresan VEGFR1 (PAE Flt) en tanto que el control positivo, Avastin, inhibe la fosforilación de VEGFR1.

Las Figura 17A, Figura 17B, Figura 17C y Figura 17D muestran que r84/PGN311 conduce a una reducción significativa en el crecimiento de tumores producidos por líneas de células de cáncer de pulmón de células no

pequeñas. La Figura 17A, Figura 17B, Figura 17C y Figura 17D muestran resultados de estudios que usan un modelo de ratón *in vivo* y cuatro diferentes líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, H460 (Figura 17A), H1299 (Figura 17B), H358 (Figura 17C) y A549 (Figura 17D). El efecto de r84/PGN311, Avastin o un anticuerpo de control (Synagis o XTL) en el peso del tumor se muestra (peso medio de tumores +/- SEM se muestra). Los ratones tratados con r84/PGN311 y Avastin tienen pesos tumorales medios que son significativamente menores que los animales tratados con control. r84/PGN311 y Avastin de esta manera son efectivas en el control del crecimiento de las líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas. r84/PGN311 se desempeña mejor que Avastin al menos en los modelos H460 (Figura 17A), H1299 (Figura 17B) y el A549 (Figura 17D). r84 es significativamente mejor que Avastin en el modelo A549 (Figura 17D).

Las Figuras 18A(a)-18C muestran que la densidad de vasos linfáticos en tumores tratados con r84 es significativamente menor que en los tumores de control. Las Figuras 18A(a)-18A(f) son tinciones de inmunofluorescencia de secciones congeladas de tumor MDA-MB-231 que muestran los marcadores linfáticos, podoplanina (verde), Prox1 (rojo) y las imágenes fusionadas, en los tumores tratados con control (paneles superiores) y tratados con r84 (paneles del fondo). Las Figuras 18B(a)-18B(b) muestran secciones de tumor MDA-MB-231 teñidas para LYVE-1 en tumores tratados con control (figura 18B(a)) y tratados con r84 (figura 18B(b)). El patrón de tinción de

LYVE-1 (Figuras 18B(a)-18B(b)) es similar a aquel para podoplanina y Prox1 (Figuras 18A(a)-18A(f)). El área completa de cada sección tumoral teñida con LYVE-1 se examinó a un menor aumento y se determinó el por ciento de área positiva a LYVE-1 para cada campo usando el software de formación de imágenes NIS-Elements (Figura 18C). Los diez campos con el área de mayor por ciento positivo a LYVE-1 se promediaron conjuntamente para producir una puntuación final para cada tumor y se probaron medias de grupo para significación por una prueba t de estudio no apareada. El por ciento de área positiva LYVE-1 de tumores de control (7.03 ± 1.013; n = 6) fue significativamente mayor que los tumores tratados con r84 (2.23 ± 0.986; n = 5), con P = 0.0042.

La Figura 19 muestra que r84 en formatos de IgG quiméricos completamente humanos y murinos se une tanto a VEGF murino como VEGF humano. El VEGF humano (0.5 µg/mL, R&D) o VEGF de ratón (0.5 µg/mL, Sigma) se revistió en sobre el fondo de placas de 96 concavidades. Las concavidades se bloquearon y luego se incubaron con la concentración indicada de r84 (líneas azules) o r84 quimérico de ratón (líneas verdes). Se detectó el anticuerpo unido a las concavidades mediante incubación con anticuerpo conjugado a HRP anti-ratón o Fc anti-humano. Se presenta la absorbancia promedio.

La Figura 20A y Figura 20B muestran que r84/PGN311 inhibe de manera potencial la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR2. Se usaron células que expresan HDMEC (Figura 20A) y PAE KDR

(Figura 20B) en los ensayos de trans-concavidad. Las células ya sea no se estimularon (NS), o se expusieron a VEGF a 100 ng/ml para estimular la migración (VEGF), y se probó la capacidad de un exceso molar de 500 veces de los anticuerpos r84, Avastin (Avas) o control (Cntl) (formato IgG) para inhibir la migración inducida por VEGF. VEGF induce migración en comparación a células no estimuladas ($p<0.01$). r84 y Avastin inhiben la migración inducida por VEGF (***, p0.0001 vs. VEGF solo).

La Figura 21 muestra que r84/PGN311 no inhibe la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR1. Las células que expresan PAE Flt1 ya sea no se estimularon (NS), o se expusieron a VEGF (VEGF) para estimular la migración (VEGF), y se probó la capacidad de los anticuerpos r84, Avastin (Avas) o de control (Cntl) para inhibir la migración inducida por VEGF. VEGF induce migración en comparación a células no estimuladas. Avastin inhibe significativamente la migración inducida por VEGF en tanto que no lo hace r84. De esta manera, la Figura 21 muestra que r84/PGN311 no inhibe la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR1. PAE Flt1, células endoteliales que expresan exclusivamente VEGFR1, se agotaron de suero durante 24 horas y luego se colocaron en placa en medio libre de suero en inserciones de trans-concavidad (poros 8 µM, 5,000 células/inserción). La migración a la parte inferior de la membrana se estimuló al adicionar lo siguiente a la concavidad por abajo de la inserción: medio libre de suero (NS); VEGF (100 ng/ml); VEGF + IgG de control (Cntl); VEGF + Avastin (Avastin);

VEGF + r84 (r84). Se permitió que las células migraran durante 24 horas tiempo en el cual se removieron las membranas, las células se removieron de la superficie superior de la membrana, se fijaron, se tiñeron con DAPI. Los núcleos teñidos de DAPI en la parte inferior de la membrana entonces se contaron por microscopía de fluorescencia y se cuantificaron usando software (Elements, Nikon). *, $p<0.05$ r84 vs Avastin; **, $p<0.01$ Avastin vs control.

La Figura 22 muestra que r84/PGN311 reduce de manera notable el crecimiento de células tumorales pancreáticas Panc1 en ratones. A ratones que tienen células de adenocarcinoma pancreático Panc1 se les dio ya sea r84/PGN311 IgG o Synagis (control negativo). Los volúmenes tumorales se delinearon durante el transcurso de tiempo del tratamiento. De esta manera, la Figura 22 muestra que r84/PGN311 reduce el crecimiento de xenoinjertos tumorales, pancreáticos, humanos, subcutáneos. Se inyectaron células tumorales Panc1 de manera subcutánea en ratones SCID ($2x10^6$ células/animal) en el día 0. Los animales se trataron iniciando en el día 1 2x/semana con 500 µg de una IgG de control (Synagis) o r84. El volumen tumoral se monitorizó con el paso del tiempo usando calibradores. Se muestra el volumen tumoral medio (SEM) (n=5/grupo) versus día después de inyección de células tumorales (TCI).

La Figura 23 muestra que la versión quimérica de ratón de r84/PGN311 prolonga la supervivencia de ratones que tienen tumores mamarios 4T1 singenéicos. Se inyectaron tumores 4T1 murinos de manera ortotópica en ratones Balb/C

(n=8 ratones por grupo). Se administró ya sea la versión quimérica de ratón de r84/PGN311 (mcr84, línea roja) o de control (Control, línea negra) mediante inyección y i.p. dos veces por semana iniciando en el día 12 y continuando durante 3 semanas. r84/PGN311 prolongó la supervivencia en comparación al control.

La Figura 24 muestra el nivel de VEGF de ratón en sueros de ratones que tienen tumor que se trataron con IgG de control, avastin, 2C3 o r84 (como se indica). Los sueros se recolectaron y valoraron por ELISA para el nivel de VEGF de ratón usando un kit de R&D systems. Además, se pre-clarificó una alícuota de sueros de ratones tratados con r84 con perlas Proteína G. también se probó el sobrenadante de los sueros clarificados de Proteína G (r84 supe).

La Figura 25 muestra que r84, y a un menor grado Avastin (bev), disminuye la infiltración de células CD11b+/Gr1+ en tumores MDA-MB-231 *in vivo*, en tanto que no lo hace 2C3. La reducción para r84 es 39 %. El ANOVA unidireccional indica que la infiltración disminuida observada con animales tratados con r84, pero no con animales tratados con 2C3 o Avastin (bev), es estadísticamente diferente de los animales tratados con control (designado **, $p<0.01$)

## Descripción Detallada de la Invención

Los tumores sólidos y carcinomas dan cuenta de más de 90 % de todos los cánceres en el hombre. Aunque se ha investigado el uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas en la terapia de linfomas y leucemias, estos agentes han sido decepcionadamente inefectivos en ensayos

clínicos contra carcinomas y otros tumores sólidos (Abrams y Oldham, 1985). Una razón principal para la inefectividad de los tratamientos basados en anticuerpo es que no se transportan fácilmente las macromoléculas en los tumores sólidos. Incluso una vez dentro de una masa tumoral, estás moléculas fallan en distribuirse uniformemente debido a la presencia de uniones estrechas entre las células tumorales, estroma fibroso, gradientes de presión intersticial y barreras del sitio de unión (Dvorak et al., 1991a).

Al desarrollar nuevas estrategias para tratar tumores sólidos, los métodos que comprenden selección como objetivo de la vasculatura del tumor, en lugar de las células tumorales, ofrecen ventajas distintas. Una distribución o bloqueo efectivo de los vasos tumorales detienen flujo sanguíneo a través del tumor y da por resultado una avalancha de muerte de células tumorales. Las construcciones de anticuerpo-toxina y anticuerpo-coagulante se han usado ya de manera efectiva en la selección de objetivos específicos y la destrucción de vasos tumorales lo que da por resultado la necrosis tumoral (Burrows et al, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,855,866; 5,877,289; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555; 6,093,399.

Donde se usan anticuerpos, factores de crecimiento u otros ligandos de unión para distribuir de manera específica un coagulante a la vasculatura tumoral, estos agentes se llaman "coaguligandos". Un coagulante actualmente preferido para el uso en los coaguligandos es el factor de tejido truncado (tTF) (Huang et al, 1997; WO

96/01653; Patente de los Estados Unidos No. 5,877,289). El TF es el iniciador principal de la coagulación sanguínea. En los sitios de lesión el Factor VII/VIIa en la sangre entra en contacto con, y se une a, TF en células en tejidos perivasculares. El complejo TF: VIIa, en la presencia de la superficie de fosfolípidos, activa los factores IX y X. Esto a su vez, conduce a la formación de trombina y fibrina y finalmente, un coagulo sanguíneo.

Se han descrito una variedad de moléculas objetivo adecuadas que están disponibles en el endotelio tumoral pero en su mayor parte ausentes del endotelio normal. Por ejemplo se pueden utilizar objetivos expresados, tal como endoglina, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, un TIE, un ligando reactivo con LAM-1, un receptor de VEGF/VPF, un receptor de FGF, $\alpha_v\beta_3$ integrina, pleyotropina o endosialina (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,855,866; 5,877,289 y 6,004,555; Burrows et al, 1992; Burrows y Thorpe, 1993; Huang et al, 1997; cada una incorporada en la presente como referencia).

Otros objetivos inducibles por el ambiente tumoral natural o intervención posterior por el hombre también son entidades seleccionables, objetivo como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,776,427 y 6,036,955; cada una incorporada en la presente como referencia). Cuando se usa en unión con supresión anterior en tejidos normales e inducción vascular de tumor, los antígeno de MHC Clase II también se pueden emplear como objetivos (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,776,427; 6,004,554 y 6,036,955; cada una incorporada en la presente

como referencia).

Los objetivos adsorbidos son otro grupo adecuado, tal como VEGF, FGF, TGFβ, HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se une a un TIE o una isoforma de fibronectina asociado a tumor (Patentes de los Estados Unidos No. 5,877,289 y 5,965,132; cada una incorporada en la presente como referencia). Las isoformas de fibronectina son ligandos que se unen a la familia de integrina de receptores. Las isoformas de fibronectina asociadas a tumor son componentes seleccionables como objetivo tanto de la vasculatura tumoral como del estroma tumoral.

Un marcador actualmente preferido para estas aplicaciones de selección de objetivos clínicos es VEGF asociado a receptor. En realidad, los montajes de los complejos de VEGF:receptor son uno de los marcadores más específicos de la vasculatura tumoral observados a la fecha (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,877,289; 5,965,132 y 6,051,230; Lin-Ke et αl., 1996; Dvorak et al, 1991b).

El complejo de VEGF:receptor presente un objetivo atractivo para la distribución específica de fármacos y otros efectores al endotelio tumoral, puesto que los tumores son ricos en citocinas y factores de crecimiento y puesto que los receptores de VEGF se favorecen en expresión bajo las condiciones hipóxicas que se encuentran en la mayoría de los tumores sólidos (Mazure et al, 1996; Forsythe et al, 1996; Waltenberger et al., 1996; Gerber et al, 1997; Kremer et al, 1997). El favorecimiento de la expresión tanto de ligando como de su receptor específicamente en el micro ambiente tumoral

conduce a una alta concentración de receptor ocupado en el endotelio vascular tumoral, en comparación con el endotelio en tejido normal (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,877,289 y 5,965,132). Dvorak y colaboradores también mostraron que los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el N-término de VEGF tiñeron se manera selectiva los vasos sanguíneos tumorales después de la inyección en ratones que tienen tumores singeneicos (Lin-Ke et al, 1996).

El papel de VEGF como un objetivo para intervención clínica no se limita a inmunotoxina o terapias de coaguligandos. En realidad, el VEGF es uno de los factores claves comprendidos en la angiogénesis de tumores sólidos (Ferrara, 1995; Potgens et al, 1995), siendo tanto un potente agente de permeabilidad (Senger et al, 1983; Senger et al, 1990; Senger et al, 1986) como un mitógeno de células endoteliales (Keck et al, 1989; Connolly et al, 1989; Thomas, 1996). El enlace entre VEGF y la angiogénesis ha conducido a las propuestas de varias estrategias terapéuticas apuntadas a la intervención de VEGF (Siemeister et al, 1998).

A. VEGF y receptores de VEGF

La isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, llamado de manera abreviada "VEGF" en la presente solicitud) es una citocina multifuncional que se induce por hipoxia y mutaciones oncogénicas. El VEGF es un estimulante primario del desarrollo y mantenimiento de una red vascular en la embriogénesis. Funciona como un potente agente inductor de

permeabilidad, un agente quimiotáctico de células endoteliales, un factor de supervivencia endotelial, un factor de proliferación de células endoteliales (Thomas, 1996; Neufeld et al, 1999). Su actividad se requiere para desarrollo embriónico normal (Fong et al, 1995; Shalaby et al, 1995), puesto que la interrupción buscada de uno o ambos alelos de VEGF da por resultado letalidad embriónica (Carmeliet et al, 1996; Ferrara et al., 1996).

El VEGF es un factor importante que activa la angiogénesis o vasculogénesis en numerosos procesos fisiológicos y patológicos incluyendo curación de heridas (Frank et al, 1995; Burke et al, 1995), retinopatía diabética (Alon et al, 1995; Malecaze et al, 1994), psoriasis (Detmar et al, 1994), aterosclerosis (Inoue et al, 1998), artritis reumatoide (Harada et al, 1998; Nagashima et al, 1999), crecimiento de tumores sólidos (Plate et al, 1994; Claffey et al, 1996).

Una amplia variedad de células y tejidos producen VEGF, que existen en al menos cinco isoformas (121, 145, 165, 189, y 206 aminoácidos) que son variantes de empalme codificadas por el mismo gen (Houck et al, 1991; Ferrara et al, 1991; Tischer et al, 1991). Las dos isoformas más pequeñas, 121 y 165, se segregan de células (Houck et al, 1991; Anthony et al, 1994). El VEGF segregado es un dímero obligado de entre 38-46 kDa en el cual se enlazan los monómeros por dos enlaces de disulfuro.

Los dímeros de VEGF se unen con alta afinidad a dos receptores bien caracterizados, VEGFR1 (FLT-1) y VEGFR2 (KDR/Flk-1), que se expresan de manera selectiva en células

endoteliales (Flt-1 y Flk-1 son los homólogos de ratón). La $K_d$ de la unión de VEGF al VEGFR1 y VEGFR2 es de 15-100 pM y 400-800 pM, respectivamente (Terman et al, 1994). Una tercera proteína de superficie celular, recién identificada, la neuropilina-1, también se une a VEGF con alta afinidad (Olander et al, 1991; De Vries et al., 1992; Terman et al., 1992; Soker et al., 1998).

VEGFR1 y VEGFR2 son miembros de la familia de tirosina-cinasas de receptor Tipo III (RTK III) que se caracteriza por siete repeticiones extracelulares tipo IgG, un dominio transmembrana de extensión individual, y un dominio de tirosina-cinasa de división intracelular (Mustonen y Alitalo, 1995). Hasta muy recientemente, se pensó que VEGFR1 y VEGFR2 se expresan casi exclusivamente en células endoteliales (Mustonen y Alitalo, 1995). Aunque VEGFR1 y VEGFR2 se han reportado como que tienen diferentes funciones con respecto a la estimulación de la proliferación, migración y diferenciación de células endoteliales (Waltenberger et al, 1994; Guo et al, 1995), el papel preciso que cada receptor juega en la biología de VEGF y en la homeostasis de células endoteliales no se definió claramente antes de la presente invención.

Los estudios recientes que usan los ratones con supresión han mostrado que cada uno de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 es esencial para la vasculogénesis, angiogénesis y desarrollo del embrión (Fong et al, 1995; Shalaby et al, 1995; Hiratsuka et al, 1998). En estudios de supresiones letales, fueron diferentes los fenotipos asociados con la carencia de cada receptor. La interrupción buscada de

VEGFR2 dio por resultado un embrión que careció de diferenciación de células endoteliales y falló en formar islotes sanguíneos del saco vitilino o en pasa a través de la vasculogénesis (Shalaby et al, 1995). Los mutantes nulos en VEGFR1 mostraron vasculogénesis deteriorada, montaje desorganizado de células endoteliales, y vasos sanguíneos dilatados (Fong et al, 1995; Hiratsuka et al, 1998). El VEGFR1 tiene evidentemente un papel biológico vital.

El VEGFR1 tiene una mayor afinidad para VEGF que para VEGFR2, aunque tiene una menor actividad de tirosina-cinasa. Esto sugiere que el dominio extracelular de VEGFR1 es particularmente importante. En esta hipótesis se soportó fuertemente por los resultados de estudios en ratones con supresión en los cuales se suprimió el domino de tiroxina-cinasa de VEGFR1 en tanto que se deja intacto el dominio de unión de VEGF (Hiratsuka et al, 1998). Los embriones deficientes en VEGFR1-tirosina cinasa desarrollaron vasos sanguíneos normales y sobrevivieron a término (Hiratsuka et al, 1998).

Además de las supresiones anteriores (Fong et al, 1995; Shalaby et al, 1995), los estudios de Hiratsuka et al. (1998) indican que VEGFR1 tiene un papel biológico vital. Sin embargo, no parece ser un factor crítico la señalización de tirosina-cinasa. Es interesante señalar que los macrófagos de los ratones suprimidos de VEGFR1 no exhiben quimiotaxis inducida por VEGF (Hiratsuka et al, 1998; incorporada en la presente como referencia), implicando de este modo que VEGFR1 es el receptor responsable de mediar esta importante respuesta biológica

VEGF.

Ciertos grupos han reportado que VEGFR2 es el receptor de señalización dominante en mitogénesis inducida por VEGF, y permeabilidad (Waltenberger et al., 1994; Zachary, 1998; Korpelainen y Alitalo, 1998). El papel de VEGFR1 en la función de células endoteliales es mucho menos claro, aunque se documentaron funciones en migración de macrófagos y quimiotaxis en los estudios de Hiratsuka et al (1998) analizados anteriormente.

Clauss et al. (1996; incorporado en la presente como referencia) también reporto que VEGFR1 tiene papeles importantes en la activación y quimiotaxis de monocitos. En realidad, las células de linaje de macrófagos/monocitos expresan solo VEGFR1, que es el receptor responsable de mediar la reclutación de monocitos y la actividad procoagulante (Clauss et al, 1996). La unión de VEGF al VEGFR1 en monocitos y macrófagos también actúa al aumentar el calcio intracelular y al inducir fosforilación de tirosina (Clauss et al, 1996).

La unión del dímero de VEGF al receptor de VEGF se cree que induce la dimerización del receptor. La dimerización del receptor entonces provoca la autotransfosforilación de residuos específicos de tirosina, Y801 y Y1175, y Y1213 y Y1333 en el lado intracelular de VEGFR2 y VEGFR1, respectivamente. Esto conduce a una cascada de transducción de señales, que incluye la activación de fosfolipasa Cγ (PLCγ) y fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y un incremento en iones de calcio intracelulares (Hood y Meininger, 1998; Hood et al, 1998;

Kroll y Waltenberger, 1998).

Los eventos intracelulares adicionalmente en la dirección 3' en la señalización inducida por VEGF son menos claros, aunque varios grupos han mostrado que se produce óxido nítrico (NO) después de la activación por VEGF de VEGFR2 (Hood y Meininger, 1998; Hood et al, 1998; Kroll y Waltenberger, 1998). La activación de VEGFR2, pero no de VEGFR1, por VEGF también se ha mostrado que activa Src y la cascada de Ras-MAP-cinasa incluyendo las MAP cinasas, ERK1 y ERK2 (Waltenberger et al., 1994, 1996; Kroll y Waltenberger, 1997).

El papel de VEGFR1 en la función de células endoteliales es mucho menos claro, particularmente puesto que ratones deficientes de F1t-1-tirosina-cinasa son viables y desarrollan vasos normales (Hiratsuka et al., 1998). Se ha sugerido que el papel biológico principal de VEGFR1 en el endotelio es como una molécula que no se une al ligando de señalización, o receptor de "señuelo" que se puede requerir para presentar VEGF al VEGFR2.

La conexión entre VEGF y condiciones angiogénicas patológicas ha impulsado varios intentos para bloquear la actividad de VEGF. Estos incluyen el desarrollo de ciertos anticuerpos neutralizantes contra VEGF (Kim et al., 1992; Presta et al., 1997; Sioussat et al., 1993; Kondo et al., 1993; Asano et al., 1995). Los anticuerpos contra receptores de VEGF también se han descrito, tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,840,301 y 5,874,542 y, subsiguiente a la presente invención, en la WO 99/40118. Las Patentes de los Estados

Unidos Nos. 5,840,301 y 5,874,542 sugieren en realidad que el bloqueo de los receptores de VEGF en lugar del VEGF mismo es ventajoso por varias razones.

También se han re4portado (Saleh et al., 1996; Cheng et al, 1996; cada una incorporada en la presente como referencia) construcciones de recepto soluble (Kendall y Thomas, 1993; Aiello et al., 1995; Lin et al., 1998; Millauer et al., 1996), inhibidores tirosina-cinasa (Siemeister et al., 1998), estrategias antisentido, aptámeros y ribozimas de ARN contra VEGF o receptores de VEGF.

B. Anticuerpos anti-VEGF

B1. Propiedades del Anticuerpo

La aplicación de varios métodos inhibitorios también ha mostrado que es al menos algo efectiva ya sea en el bloque de la angiogénesis y/o en la supresión del crecimiento tumoral al interferir con la señalización de VEGF. En realidad, se ha mostrado con los anticuerpos monoclonales contra VEGF inhiben el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos y la formación de ascitis en ratones (Kim et al, 1993; Asano et al, 1995; 1998; Mesiano et al, 1998; Luo et al, 1998a; 1998b; Borgstrom et al, 1996; 1998).

El anticuerpo A4.6.1 es un anticuerpo anti-VEGF de alta afinidad capaz de bloquear la unión de VEGF tanto a VEGFR1 y VEGFR2 (Kim et al, 1992; Wiesmann et al, 1997; Muller et al, 1998). La mutagénesis de exploración de alanina y la cristalografía de rayos X del VEGF unido por el fragmento Fab de A4.6.1 mostró que el epítopo en VEGF al

cual se une A4.6.1 está centrado alrededor de los aminoácidos 89-94. Estos datos estructurales demuestran que A4.6.1 inhibe de manera competitiva VEGF de la unión a VEGFR2, pero inhibe VEGF de la unión a VEGFR1 más probablemente por impedimento estérico (Muller et al, 1998; Keyt et al, 1996; cada una incorporada en la presente como referencia)

A4.6.1 es el anticuerpo anti-VEGF neutralizante más ampliamente usado en la literatura a la fecha. Se ha mostrado que inhibe el crecimiento y permeabilidad vascular inducida por VEGF de una variedad de tumores humanos en ratones (Brem, 1998; Baca et al, 1997; Presta et al, 1997; Mordenti et al, 1999; Borgstrom et al, 1999; Ryan et al, 1999; Lin et al, 1999; cada uno incorporada en la presente como referencia de manera específica). A4.6.1 también inhibe la formación de ascitis en un modelo en ratón de carcinoma ovárico humano bien caracterizado y la diseminación tumoral en un modelo en ratón de metástasis. Se ha humanizado A4.6.1 por técnicas de visualización en fagos monovalentes (Brem, 1998; Baca et al, 1997; Presta et al, 1997; cada una incorporada en la presente como referencia). El anticuerpo humanizado resultante llamado Avastin (bevacizumab), se ha probado para uso clínico (Hurwitz et al, 2004).

A pesar del éxito en la técnica con anticuerpos neutralizantes contra VEGF, los presentes inventores se dieron cuenta que nuevos anticuerpos, particularmente anticuerpos humanos con un modo más precisamente definido de interacción con VEGFR1 (FLT-1) y/o VEGFR2 (KDR/Flk-1)

serían de beneficio por una variedad de razones. Por ejemplo, el desarrollo de anticuerpo anti-VEGF que bloquean de manera selectiva la interacción de VEGF con solo uno de los dos receptores de VEGF permitiría una disección más precisa de las rutas activadas por VEGF en células que expresan tanto VEGFR1 como VEGFR2.

Los presentes inventores creyeron que los anticuerpos humanos de especificidad de epítopo definida que bloquearon la unión de VEGF a solo un receptor (VEGFR2) tendrán beneficios clínicos. Los estudios con ratones con supresión de Hiratsuka et al. (1998) mostraron que tanto VEGFR1 como VEGFR2 tienen papeles biológicos importantes. Antes de la presente invención, las oportunidades realistas para intervención terapéutica dirigida a inhibir los efectos mediados por VEGF solo a través de uno de los dos receptores se impidieron por la carencia de agentes inhibitorios, adaptados, efectivos, optimizados para administración humana.

Dada la necesidad de anticuerpos humanos específicos terapéuticos que bloqueen la angiogénesis, se han identificado anticuerpos humanos que son reactivos contra un epítopo en VEGF que bloquea de manera específica y sustancial su interacción con el receptor 2 de VEGF (VEGFR2, KDR/Flk-1), pero no bloquea de manera sustancial su interacción con el receptor 1 de VEGF (VEGFR1, Flt-1).

Los presentes inventores desarrollaron primero una variedad de anticuerpos anti-VEGF completamente humanos que compiten con el anticuerpo murino 2C3 par la unión a VEGF. Se seleccionaron para análisis adicional varios

clones de anticuerpo que presentan alta afinidad para VEGF y que muestran interrupción selectiva de la interacción entre VEGF y VEGFR2 y no entre VEGF y VEGFR1. Eventualmente uno de estos clones, llamado un "clon madre", se sometió a maduración, después de lo cual se seleccionó un nuevo clon que presentó mejoras significativas e importantes adicionales, por ejemplo, una mejor afinidad de unión tanto a VEGF humano como VEGF de ratón, una mayor estabilidad en suero y una tendencia reducida a formar agregados en el formato scFv. Este anticuerpo se llamó r84 (y PGN311) y presente afinidad de unión a VEGF, con una Kd en un formato de IgG en el orden de 7nM o menos, que está bien dentro del intervalo mostrado que es efectivo en terapia humana. Adicionalmente, se muestra en la presente que el anticuerpo r84 reduce de manera significativa el volumen tumoral/crecimiento tumoral en varios modelos de tumor *in vivo* aceptados en la técnica (específicamente, el modelo de tumor de rabdomiosarcoma A673, del modelo de tumor de células de cáncer de mama MDA-MB 231, varios modelos de cáncer de pulmón humano de células no pequeñas, el modelo de tumor de células de cáncer pancreático Panc 1 y el modelo de tumor mamario 4T1). De manera notable, los resultados con r84 son al menos tan buenos como el anticuerpo anti-VEGF humanizado llamado Avastin, que se ha probado para uso clínico. Un anticuerpo completamente humano tal como r84 proporcionará ventajas con respecto al anticuerpo humanizado disponible. Además, r84 tiene la propiedad ventajosa de unirse a VEGF de ratón como VEGF humano. La capacidad para unirse a VEGF de ratón es una

ventaja importante que el anticuerpo r84 presenta con respecto a 2C3 y Avastin. Adicionalmente, los resultados del modelo de tumor MDA-MB 231 también muestran que r84 reduce de manera significativa la infiltración de macrófagos asociados a tumor, que ahora se sabe que juegan un papel positivo en el desarrollo y metástasis de cáncer y de esta manera que son perjudiciales a los pacientes. A este respecto, se ha mostrado que r84 reduce de manera significativa la expresión del marcador de macrófagos Mac-3 ($p<0.01$). Además, los resultados del modelo de tumor MDA-MB 231 muestran que r84 reduce de manera significativa ($p<0.0001$) el número de vasos sanguíneos en tumores y por lo tanto reduce de manera significativa la densidad de microvasos (MVD) en tumores.

También se ha mostrado que r84 inhibe de manera significativa la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR2 y reduce de manera significativa la densidad de vasos linfáticos en tumores MDAMB231. El efecto en la densidad de vasos linfáticos soporta el uso de los anticuerpos humanos de la invención para inhibir linfangiogénesis.

Una propiedad ventajosa adicional mostrada por r84 es la capacidad para reducir de manera significativa la infiltración de células supresoras derivadas de mieloides, en particular células CD11b+/Gr1+, en tumores. Adicionalmente, esta propiedad no se muestra por el anticuerpo 2C3 y solo a un nivel muy reducido por Avastin. De esta manera, los estudios adicionales en ratones que tienen el tumor MDA-MB-231 han mostrado que sustancialmente

menos células positivas CD11b/Gr1 doble si infiltran en tumores en animales tratados con r84 como lo opuesto al control. En estudios comparativos, ni el anticuerpo 2C3 ni Avastin mostraron una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+, aunque se midió alguna reducción en animales tratados con Avastin. La reducción en el número de células doblemente positivas observadas en animales tratados con r84/PGN311 es de 39 % (Figura 25).

La infiltración reducida de células supresoras derivadas de mieloide CD11b+/Gr1+ es de interés especial, puesto que las células que expresan ambos marcadores se han asociado recientemente con la mediación de capacidad de refracción tumoral a terapia anti-VEGF (Shojaei et al., 2007). Las células supresoras derivadas de mieloide (CD11b+Gr1+) también son un importante contribuyente al progreso tumoral. En el microambiente tumoral, estas células segregan mediadores inmunosupresores e inducen disfunción de linfocitos T (Gabrilovich et al., 2001; Serafini et al., 2004).

Puesto que las células CD11b+/Gr1+ se asocian con las capacidad de refracción tumoral a terapia anti-VEGF y contribuyen al progreso del tumor, el efecto de r84/PGN311 para reducir la infiltración o reclutamiento de estas células en tumores tiene claramente una importancia potencial para aplicaciones terapéuticas de r84, en particular aplicaciones terapéuticas relacionadas al tratamiento de enfermedades angiogénicas, incluyendo cáncer.

En realidad, como lo muestran en la presente los resultados que la infiltración tumoral de células CD11b+/Gr1+ es menos pronunciadas/significativamente menor en los animales tratados con r84/PGN311, sugiere que el tratamiento con r84 probablemente está menos propenso del desarrollo de resistencia a fármacos o capacidad de refracción a terapia anti-VEGF que el tratamiento con otros fármacos que tienen como objetivo VEGF, por ejemplo otros anticuerpos anti-VEGF, además, dado el papel propuesto de las células CD11b+/Gr1+ en progreso tumoral, la capacidad de r84/PGN311 para reducir la infiltración o reclutamiento de estas células en tumores puede formar bien parte del mecanismo comprendido en la actividad antitumoral, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral mostrada por r84/PGN311.

También se ha mostrado que la administración crónica de r84/PGN311 no induce toxicidad en ratones.

Estas son indicaciones positivas adicionales del potencial terapéutico del anticuerpo r84.

B2. Anticuerpos Humanos Anti-VEGF Bloqueadores de VEGFR2

Una parte importante de esta invención, confirmada usando ELISA, ensayos de unión a receptor y ensayos de activación de receptor, es que los anticuerpos de la invención bloquean de manera selectiva la interacción de VEGF con VEGFR2 (KDR/Flk-1), pero no con VEGFR1 (FLT-1). Los anticuerpos inhibe la fosforilación inducida por VEGF del VEGFR2 inhibe la señalización mediante el VEGFR2. Los anticuerpos tienen también una potente actividad anti-

tumoral, que detiene el crecimiento de tumores sólidos humanos establecidos en modelos en animales aceptados en la técnica de cáncer humano. Además, los anticuerpos humanos de la invención tienen propiedades anti-angiogénicas y reducen la densidad de microvasos en los tumores.

Estas propiedades demuestran la utilidad de los anticuerpos al diseccionar las rutas que se activan por VEGF en células que expresan tanto VEGFR1 y VEGFR2, así como resaltan la importancia de la actividad de VEGFR2 en el proceso del crecimiento o supervivencia tumoral. De manera más importante, proporcionan un modo único de intervención terapéutica para un anticuerpo humano, que permite la inhibición específica de la angiogénesis inducida por VEGFR2, sin inhibición concomitante de eventos mediados por VEGFR1, tal como función de osteoclastos y condroclastos.

Los anticuerpos de la presente invención, llamados de manera abreviada "anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2", representan una ventaja en el campo y proporcionan numerosa ventajas, tanto en términos de usos en forma no conjugada o "desnuda" y cuando se conjugan a o se asocian con otros agentes terapéuticos.

Los estudios de unión *in vitro* de la presente invención demuestran que los anticuerpos humanos bloquean la unión de VEGF a VEGFR2, pero no inhiben la unión de VEGF a VEGFR1.

Los anticuerpos humanos de la presente invención de esta manera se mejoran de manera significativa sobre otros anticuerpos bloqueadores VEGF, incluyendo el

anticuerpo A4.6.1 murino y su contraparte humanizadas, Avastin (bevacizumab). Los anticuerpos A4.6.1 y Avastin anti-VEGF bloquean la unión de VEGF a ambos receptores de VEGF. Los estudios cristalográficos y de mutagénesis han mostrado que los epítopos de unión para VEGFR2 y VEGFR1 se concentran hacia los dos polos simétricos del dímero de VEGF (Wiesmann et al, 1997; Muller et al, 1997). Los determinantes de unión en VEGF que interactúan con los dos receptores se traslapan parcialmente y se distribuyen sobre cuatro diferentes segmentos que abarcan de un lado a otro la superficie del dímero (Muller et al, 1998). El anticuerpo 4.6.1 se une a una región de VEGF dentro de la región de unión a receptor de ambos receptores (Muller et al, 1998).

Los estudios del efecto de los anticuerpos humanos de la invención en fosforilación inducida por VEGF de los receptores mostraron que los anticuerpos bloquean la fosforilación inducida por VEGF del VEGFR2. Los estudios también han mostrado que los anticuerpos humanos de la invención inhiben la señalización celular vía VEGFR2, por ejemplo, se ha mostrado que los anticuerpos inhiben la fosforilación de Erk1/2 y PLC-γ en ensayos *in vitro*.

Los anticuerpos humanos de la invención inhiben el crecimiento de tipos de tumores humanos *in vivo*. La magnitud de supresión de crecimiento tumoral por los anticuerpos humanos de la invención es similar a aquella usando diferentes anticuerpos neutralizantes anti-VEGF, incluyendo Avastin. La efectividad de estos anticuerpos humanos, que son similares a lo que otros investigadores

han encontrado usando diferentes anticuerpos anti-VEGF, demuestra además el papel de VEGF en la angiogénesis tumoral y crecimiento tumoral. Sin embargo, los anticuerpos humanos de la invención deben proporcionar un producto terapéutico más seguro, con base en las propiedades inhibitorias específicas analizadas en la presente y en vista de que son anticuerpos complemente humanos.

El hecho que se pueden lograr regresiones, en lugar de estástasis tumoral, sugiere que VEGF está proporcionando más que solo una seña angiogénica para el endotelio tumoral. Benjamin et al. (1999) reportó recientemente que los tumores contienen una gran fracción de vasos sanguíneos inmaduros que aún tienen que establecer contacto con células periendoteliales y que estos vasos sanguíneos son dependientes de VEGF para la supervivencia. Es posible que la neutralización de VEGF provoque que estos vasos sanguíneos y maduros sufran apoptosis, reduciendo de este modo la red vascular existente del tumor. También es posible que un proceso dinámico de remodelado vascular se presente en los tumores, que comprende tanto la formación de vasos como la regresión de vasos, y que la neutralización de VEGF impida la formación de vasos que conduzca a un cambio neto hacia la regresión de los vasos.

El hallazgo que los anticuerpos humanos de la invención suprimen el crecimiento tumoral tan completamente como Avastin (sino es que más) indica un papel dominante para VEGFR2 en la angiogénesis tumoral. El proceso de múltiples pasos de la angiogénesis requiere quimiotaxis de células endoteliales, producción, invasión, proliferación y

diferenciación de metaloproteinasa. El VEGFR1 puede no tener papel en estos procesos, o puede ayudar en el proceso por la unión de VEGF y la presentación del mismo al receptor de señalización, VEGFR2.

Las cifras comparables para los anticuerpos humanos de la invención y Avastin en el tratamiento tumoral son alta mente pertinentes: los anticuerpos humanos de la invención son al menos tan efectivos como Avastin, aunque solo inhiben la unión de VEGF a VEGFR2 y no a VEGFR1. Por lo tanto los presentes estudios indican que VEGFR1 no juega un papel notable en la angiogénesis tumoral mediada por VEGF y sugiere además que los inhibidores específicos de VEGFR1 no pueden influenciar la angiogénesis tumoral. Estos resultados también significan que los anticuerpos humanos de la invención pueden ser igualmente o más efectivos que Avastin, en tanto que provocan menos efectos secundarios.

La capacidad para bloquear específicamente la unión de VEGF hacia y la activación de VEGFR2, pero no VEGFR1 (Flt-1), tiene importancia clínica. Los anticuerpos humanos de la presente invención bloquean de esta manera la actividad angiogénica de VEGF, pero no inhiben otras acciones benéficas de VEGF, mediadas a través de VEGFR1, tal como aquellas en ciertas células inmunitarias y óseas. Un área de importancia clínica se refiere de esta manera la capacidad de los anticuerpos humanos de esta invención a funcionar *in vivo* sin inhibir los efectos benéficos de los osteoclastos y condroclastos. Esto significa que el uso de los presentes productos terapéuticos de anticuerpo humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 no se asociará con los

efectos secundarios en el uso y/o cartílago.

Los estudios *in vivo* han mostrado que VEGF acopla el remodelado, osificación y angiogénesis hipertrófica del cartílago durante la formación ósea endocondreal y que VEGF es esencial para el remodelado del cartílago (Gerber et al., 1999; incorporado específicamente en la presente como referencia). La inactivación de la señalización de VEGF a través de VEGFR1, mediante la administración de la proteína quimérica soluble del receptor VEGFR1 (Flt-(1-3)-IgG), se mostró que deteriora la formación de hueso trabecular y la expansión de la zona hipertrófica de condrocitos al disminuir el reclutamiento y/o diferenciación de los condroclastos (Gerber et al, 1999).

Adicionalmente, se ha mostrado que VEGF puede sustituir al factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF) en el soporte de la función de osteoclastos *in vivo* (Niida et al., 1999; incorporada específicamente en la presente como referencia). En estudios que usan ratones osteopetróticos (op/op) con una deficiencia en osteoclastos que resulta de una mutación en el gen de M-CSF, la inyección de M-CSF humano recombinante (rhM-CSF) permite la reclutación y supervivencia de los osteoclastos. En estudios recientes, se mostró que una inyección única de VEGF humano recombinante puede inducir de manera similar el reclutamiento de de osteoclastos en ratones op/op (Niida et al., 1999).

Niida et al. (1999) reportó que puesto que los osteoclastos se expresan predominantemente VEGFR1, y que la actividad del factor uno recombinante de crecimiento

placentario humano en la reclutación de osteoclastos fue comparable a aquel de VEGF, los efectos benéficos de la señalización de VEGF en ratones osteopetróticos (op/op) se medían mediante el receptor 1 de VEGF (VEGFR-1). Estos autores mostraron adicionalmente que los osteoclastos inducidos por rhM-CSF murieron después de que se inhibió VEGF (usando una proteína quimérica del receptor VEGFR1, VEGFR1/Fc), pero que estos efectos se anularon por inyecciones concomitantes de rhM-CSF. Los osteoclastos soportados por rhM-CSF o VEGF endógeno no mostraron diferencia significativa en la actividad *in vivo* (Niida et al., 1999).

Los ratones op/op mutantes sufren una resolución relacionada a la edad de osteopetrosis lograda por un incremento en el número de osteoclastos. En los estudios de Niida et al. (1999), la mayoría de los osteoclastos desaparecieron después de inyecciones del anticuerpo anti-VEGF, demostrando que el VEGF producido de manera endógena es responsable de la aparición de los osteoclastos en los ratones mutantes. Además, rhVEGF reemplazó rhM-CSF en el soporte de la diferenciación *in vitro* de osteoclastos. Estos resultados demuestran que M-CSF y VEGF tienen funciones traslapadas en el soporte de la función de osteoclastos y que VEGF actúa a través del receptor de VEGFR-1 (Niida et al, 1999).

De esta manera, se puede concluir que los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención no bloquean la unión y activación por VEGF a VEGFR1, pero bloquean la unión y activación por VEGF a

VEGFR2. Los efectos anti-tumorales de esta inhibición de VEGFR2 redondos se demuestran de manera clara. Estos resultados muestran que VEGFR2 es el receptor de VEGF que medía la permeabilidad y resalta su papel en la angiogénesis tumoral.

Por lo tanto esta invención valida además la inhibición de VEGF como terapia para el tratamiento de tumores sólidos. De manera más importante, la invención proporciona una variedad de nuevos anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 para intervención terapéutica, y en particular, para el uso como fármacos seguros y efectivos para inhibir la angiogénesis en tumores y otras enfermedades.

Los beneficios de la presente invención no se limitan a la carencia de efectos secundarios. Aunque estas son características importantes que tendrán beneficios notables, particularmente en el tratamiento de niños y pacientes con enfermedades óseas, los anticuerpos de la invención tienen numerosas ventajas diferentes.

Por ejemplo, los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención tienen ventajas importantes en la inhibición de las acciones perjudiciales de macrófagos asociados a tumor. Ahora se sabe que los macrófagos asociados a tumor juegan papeles importantes en el cáncer, tanto en las etapas iniciales de desarrollo como en el progreso y metástasis tumoral. Como se detalla más adelante, los anticuerpos de esta invención son idealmente adecuados para contrarrestar los efectos adversos de estos macrófagos.

La formación de una vasculatura tumoral y/o el acceso a la vasculatura del hospedador es un paso crucial en el desarrollo de tumores malignos. En realidad, la formación de una red de vasos de alta densidad, llamada "el interruptor angiogénico", está cercanamente asociada con la transición a la malignidad (Hanahan y Folkman, 1996). Ahora se sabe que los macrófagos asociados con el tumor primario juegan un papel clave tanto en el interruptor angiogénico como en el progreso a la malignidad (Lin et al., 2006). Adicionalmente, se ha mostrado que la inhibición de la infiltración de macrófagos en tumores retrasa al interruptor angiogénico y la transición a la malignidad (Lin et al., 2006).

En muchos pacientes con cáncer, la metástasis es la causa final de muerte. La invasión de células tumorales del tumor primario en el tejido conectivo circundante y vasos sanguíneos es un paso clave en el proceso metastático. Se reportó anteriormente que los macrófagos están asociados con progresos y metástasis tumoral (Lin et al., 2001). Los estudios subsiguientes han mostrado que la interacción entre las células tumorales y los macrófagos facilitan la migración de células de carcinoma en el tumor primario, y que este proceso comprende una asa paracrina (Wyckoff et al., 2004; Goswami et al, 2005).

Además, ahora se sabe que los macrófagos infiltrantes de tumor o asociados a tumor son prominentes en varios microambientes tumorales, incluyendo áreas de invasión, áreas estromales y perivasculares y áreas avasculares y perinecróticas. Las acciones de los

macrófagos en cada uno de estos microambientes tumorales estimula el progreso y metástasis tumoral al promover la motilidad, metástasis y angiogénesis de células de cáncer, respectivamente (Lewis y Pollard, 2006). Por lo tanto, recientemente los macrófagos han llegado a ser un objetivo importante en la batalla contra el cáncer (Condeelis y Pollard, 2006).

A este respecto, los anticuerpos humanos de la presente invención tienen ventajas importantes puesto que bloquean la activación de VEGFR2 y de esta manera reducen la infiltración de macrófagos en los tumores, y por lo tanto pueden reducir la transición a la malignidad, progreso y/o metástasis tumoral. Esto es válido por los resultados de estudios en animales presentados en la presente que muestran que los macrófagos asociados a tumor expresan VEGFR2, y que VEGFR2 media la quimiotaxis inducida por VEGF de estas células. También se muestra en la presente que el bloqueo selectivo de VEGFR2 provocado por los anticuerpos humanos de esta invención ejerce un potente efecto anti-cáncer. Este efecto anti-cáncer se acompaña por una reducción en la infiltración de macrófagos en el tumor, indicando que el bloqueo selectivo de la interacción de VEGF-VEGFR2 en los macrófagos del hospedador contribuye a los efectos terapéuticos observados.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de esta invención también tienen las ventajas con respecto a reducir la densidad de vasos linfáticos en los tumores. Además de egresar de células tumorales en los vasos sanguíneos tumorales, la metástasis se facilita por

la linfangiogénesis, es decir, el crecimiento de nuevos vasos linfáticos intratumorales o peritumorales a partir de los vasos preexistentes. En realidad, en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, el escape de células tumorales mediante el sistema linfático se cree que es el medio predominante por el cual las células malignas del tumor primario se siembran en sitios distantes.

Durante varios años, se pensó que la linfangiogénesis se inducía principalmente por VEGF-C y/o VEGF-D. Sin embargo un cuerpo de evidencia ha acumulado implicación de VEGF-A en la linfangiogénesis. Además, los estudios recientes han mostrado que los anticuerpos murinos contra VEGF-A son efectivos en inhibir la linfangiogénesis y metástasis tumoral *in vivo* (Whitehurst et al., 2007).

Los resultados se presentan en la presente para mostrar que los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de esta invención en realidad reducen la densidad de vasos linfáticos tumorales (Figura 18A(a)-18C). Los anticuerpos humanos de la presente invención por lo tanto inhibirán la linfangiogénesis tumoral y proporcionarán el beneficio adicional de reducir la metástasis mediante la ruta linfática, así como de inhibir la angiogénesis y escape metastático mediante vasos sanguíneos tumorales. Por lo tanto, se puede ver que los anticuerpos humanos de la presente invención tienen la capacidad de reducir la metástasis o eventos metastáticos mediante varios puntos de intervención.

Adicionalmente, los datos en la Figuras 18A(a)-18A(f) muestran que los anticuerpos de la presente

invención reducen la densidad de los vasos linfáticos tumorales como se mide por una reducción en la podoplanina y en PROX1. Puesto que la podoplanina es un marcador para cánceres de tejido blando, tal como condrosarcoma, y para tumores linfáticos, tal como sarcoma de células dendríticas foliculares) (Xie et al., 2008), y puesto que se ha implicado PROX1 en la predicción de la invasión de cáncer de colon (Petrova et al., 2008), esto enfatiza el uso de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención para tratar estas indicaciones particulares de enfermedad.

Una propiedad adicional ventajosa mostrada por los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de esta invención es la capacidad para reducir de manera significativa la infiltración o reclutamiento de células supresoras derivadas de mieloide, en particular células CD11b+/Gr1+, en tumores. Adicionalmente, no se muestra esta propiedad por el anticuerpo 2C3 y sólo a un nivel muy reducido por Avastin. Los anticuerpos preferidos de la invención pueden disminuir la infiltración o reclutamiento de células CD11b+/Gr1+ en tumores (por ejemplo, disminución del número de células doblemente positivas presentes en los tumores) por 30 % o más, preferentemente por 32 %, 34 %, 36 %, 38 % o más, en comparación a un nivel de control (por ejemplo, un tumor no tratado o un tumor tratado con un anticuerpo de control).

De esta manera, los estudios adicionales en ratones que tienen el tumor MDA-MB-231 han mostrado que sustancialmente menos células doblemente positivas a

CD11b+/Grl se infiltran en tumores en animales tratados con r84 como lo opuesto al control. En estudios comparativos, ni el anticuerpo 2C3 ni Avastin mostraron una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Grl+, aunque se midió alguna reducción en animales tratados con Avastin. La reducción en el número de células positivas dobles observada es de 39 % (Figura 25).

La infiltración reducida de células supresoras derivadas de mieloide CD11b+/Grl+ es de interés especial, puesto que las células que expresan ambos marcadores se han asociado recientemente con la mediación de la capacidad de refracción tumoral a terapia anti-VEGF (Shojaei et al., 2007). Las células supresoras derivadas de mieloide (CD11b+Grl+) también son un contribuyente importante al progreso tumoral. En microambientes tumorales, estas células segregan mediadores inmunosupresores e inducen disfunción de linfocitos T (Gabrilovich et al., 2001; Serafini et al., 2004).

Puesto que las células CD11b+/Grl+ están asociadas con capacidad de refracción tumoral a terapia anti-VEGF y contribuyen al progreso tumoral, el efecto de los anticuerpos de la invención para reducir la infiltración de estas células en tumores tiene claramente una importante potencial para aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos de la invención, en particular aplicaciones terapéuticas relacionadas al tratamiento de enfermedades angiogénicas, incluyendo cáncer.

En realidad, puesto que los resultados de la presente muestran que la infiltración tumoral de células

CD11b+/Gr1+ es menos pronunciada/significativamente menor en los animales tratados con los anticuerpos de la invención, sugiere que el tratamiento con los anticuerpos de la invención es probablemente menos propenso al desarrollo de resistencia a fármacos o capacidad de refracción a terapia anti-VEGF que el tratamiento con otros fármacos que seleccionan como objetivo VEGF, por ejemplo, otros anticuerpos anti-VEGF. Además, dado el papel propuesto de las células CD11b+/Gr1+ en el progreso tumoral, la capacidad de los anticuerpos de la invención para reducir la infiltración o reclutamiento de estas células en tumores puede formar bien parte del mecanismo comprendido en la actividad anti-tumoral, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral mostrado por los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de esta invención también han mostrado que inducen toxicidad cuando se administran de manera crónica en modelos *in vivo* de ratón.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de esta invención tienen de manera preferente la propiedad ventajosa de unirse a VEGF de ratón como VEGF humano. La capacidad para unirse a VEGF de ratón es una ventaja importante con respecto a los anticuerpos 2C3 y Avastin.

Además, los conjugados de anticuerpo basados en los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención se pueden usar para distribuir agentes terapéuticos al ambiente tumoral, en tanto que no

lo hacen muchos otros anticuerpos anti-VEGF. Los anticuerpos humanos de la invención se unen tanto a vasculatura tumoral como a estroma tumoral en la administración *in vivo*, pero no se unen a vasculatura o tejido conectivo en órganos o tejidos normales. Por lo tanto las construcciones terapéuticas basadas en los presentes anticuerpos humanos tienen la ventaja de combinar dos funciones dentro de una molécula: las propiedades anti-angiogénicas del anticuerpo o fragmento del mismo y las propiedades del agente terapéutico seleccionado para la unión. En resumen, un anticuerpo humano de la presente invención se puede usar tanto como un agente anti-angiogénico y como un agente de selección de objetivos vasculares, en tanto que muchos anticuerpos anti-VEGF de la técnica anterior no se pueden usar en la capacidad de selección de objetivos vasculares.

Puesto que el VEGFR2 es el receptor clave en el endotelio, el bloqueo de la unión de VEGF al VEGFR2 es crítico para un efecto anti-angiogénico. Aunque VEGFR1 se expresa en el endotelio, no está traduciendo señales, o es pasivo, en este contexto. Por lo tanto, la incapacidad de los anticuerpos humanos de la presente invención para bloquear la unión de VEGF a VEGFR1 es sin consecuencia a su efectividad como agentes anti-angiogénicos y anti-tumorales. En realidad, en lugar de inhibir la unión de VEGF a VEGFR1, que se presenta con los anticuerpos bloqueadores de la técnica anterior, la capacidad de los presentes anticuerpos humanos para unirse a VEGF y para no perturbar de manera sustancial las interacciones de VEGF-

VEGFR1 mejora las propiedades de distribución de fármaco de estos nuevos anticuerpos.

Los presentes inventores se dieron cuenta que los anticuerpos bloqueadores aún se esperarían que funcionaran para distribuir agentes terapéuticos al ambiente tumoral por la unión a VEGF localizado en tumor que no está unido a un receptor. De manera específica, entienden que estos anticuerpos humanos se unirán a VEGF en el estroma tumoral y distribuirán al mismo, agentes terapéuticos. Esto proporciona un depósito de fármaco alrededor del endotelio, provocando efectos citotóxicos u otros efectos destructivos en las células endoteliales vasculares y ejerciendo un efecto anti-tumoral.

El VEGF asociado con el tejido conectivo o estroma no se une a un receptor de VEGF en el sentido clásico, es decir, el receptor de superficie celular. Más bien, VEGF se une a uno o más componentes de tejido conectivo, incluyendo proteoglicanos, tal como proteoglicano de heparan-sulfato, a través de una región básica de VEGF. Estas secuencias (y los exones que codifican para las mismas) están ausentes en la proteína VEGF121 (y el ADN subyacente), de modo que esta isoforma no debe presentarse en el estroma en cantidades significativas. El VEGF en el estroma tumoral frecuentemente se llama "libre", aunque esté localizado aún dentro del tumor, de modo que "libre" significa esencialmente no unido a receptor.

Los inventores dedujeron adicionalmente que un anticuerpo humano que bloquea la unión de VEGF a uno, pero

no a ambos receptores, aún será capaz de distribuir agentes terapéuticos al ambiente tumoral por la unión al VEGF unido a receptor en la vasculatura. Ésta es una de las características ventajosas de la presente invención. Específicamente, la provisión de anticuerpos humanos que bloqueen la unión de VEGF a VEGFR2, y por lo tanto inhiban la señal angiogénica de VEGF, pero que no bloqueen la unión de VEGF a VEGFR1. Además de reducir los efectos secundarios sistémicos al mantener la señalización de VEGF mediante VEGFR1 en otros tipos de células y tejidos, estos anticuerpos humanos son capaces de localizar el complejo VEGF-VEGFR1 en la vasculatura tumoral y distribuir directamente al mismo, agentes terapéuticos.

Tanto VEGFR1 como VEGFR2 se favorecen en expresión en células endoteliales tumorales, como lo opuesto a células endoteliales en tejidos normales. VEGFR1 se expresa altamente en el endotelio vasculatura tumoral, que hace a los aspectos de selección de objetivo de la presente invención particularmente efectivos. En realidad, VEGFR1, aunque "sin señalización" en el endotelio, se expresa al menos a los mismos niveles como VEGFR2, si no es que a niveles mayores. Un factor que fundamenta este fenómeno es que VEGFR1 se favorece en expresión en respuesta tanto a hipoxia como a VEGF, en tanto que VEGFR2 sólo se favorece en expresión en respuesta a VEGF y no se ve influenciado por hipoxia.

Aunque el papel de VEGFR1 en el endotelio permanece incierto, VEGFR1 puede actuar como un receptor de señuelo para "capturar" VEGF y pasa el ligando sobre el

receptor de señalización, VEGFR2. Para que esto sea válido, se espera que el receptor de señuelo tenga una mayor afinidad para VEGF que para el receptor de señalización, que es en realidad el caso. En vista de esto, y quizá también debido a los niveles mejorados de expresión, los anticuerpos humanos bloqueadores de VEGFR2 y no bloqueadores de VEGFR1 de esta invención son ideales agentes de distribución para el tratamiento de tumores. Los conjugados terapéuticos de estos anticuerpos son capaces de inhibir de manera simultánea la angiogénesis a través de VEGFR2 y destruir la vasculatura existente al distribuir un agente terapéutico al complejo de VEGF-receptor de VEGFR1.

Los inventores no se limitan de ninguna manera al razonamiento científico anterior como una explicación para las propiedades benéficas anti-angiogénicas y localizadoras de tumor de los presentes anticuerpos humanos. Aunque la utilidad de la invención es autoevidente y no necesita teoría subyacente para ponerla en práctica, los inventores han considerado mecanismos alteARNtivos por los cuales los anticuerpos humanos bloqueadores de VEGFR2 y no bloqueadores de VEGFR1 pueden localizar de manera efectiva y especial la vasculatura tumoral.

Estos anticuerpos humanos pueden unirse a VEGF que está asociado con otra proteína conocida, o como aún no caracterizada de unión a VEGF en la superficie celular o puede unirse a VEGF que está unido a proteoglicanos de sulfato de heparano en la superficie de células endoteliales. La localización del anticuerpo también se

puede mejorar por la unión a otro miembro de la familia de VEGF de proteínas, es decir, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, que están asociados con los vasos sanguíneos, aunque esto es menos probable.

Otra propiedad ventajosa de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención es que estos anticuerpos neutralizan la señal de supervivencia o "efecto protector" de VEGF, que se media a través de VEGFR2. Además de hacer a los anticuerpos humanos más efectivos por sí mismos, esta propiedad los hace particularmente útiles en combinación con otros agentes que están impedidos por la función de supervivencia de VEGF.

Por ejemplo, VEGF protege al endotelio de la radioterapia. Por lo tanto, tanto los anticuerpos desnudos como los inmunoconjugados de la presente invención son ideales para el uso en combinación con radioterapia. Se proporcionan aún más beneficios mediante el uso de este anticuerpo humano unido a un agente radioterapéutico. Este tipo de construcción tendría la triple ventaja de: (1) ejercer un efecto anti-angiogénico a través de la porción de anticuerpo; (2) ejercer un efecto destructivo de la vasculatura tumoral a través de la distribución del agente radioterapéutico; y (3) impedir que la señal de supervivencia típica del VEGF contrarreste los efectos del agente radioterapéutico.

Otras construcciones con efectos sinérgicos similares son anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 en asociación con fármacos anti-tubulina o profármacos, agentes anti-apoptóticos y otros agentes anti-

angiogénicos. Las acciones de los agentes o fragmentos que provocan apoptosis se antagonizan por VEGF. Por lo tanto, la presente invención mejora la efectividad de estos agentes al neutralizar VEGF. Las señales de supervivencia de VEGF también se oponen a la endostatina, que limita esta terapia. Por lo tanto, en uso combinado con endostatina, los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención neutralizarán VEGF y amplificarán los efectos anti-tumorales de la endostatina. Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 también se pueden usar para distribuir de manera específica colagenasa al tumor, donde la colagenasa producirá endostatina *in situ*, logrando beneficios similares.

En todas estas combinaciones sinérgicas o mejoradas, los anticuerpos humanos y otros agentes se pueden administrar de manera separada, o los segundos agentes se pueden enlazar a los anticuerpos humanos para distribución específica (es decir, distribución dirigida al VEGFR1). En combinaciones con endostatina, se preferirán conjugados químicos o proteínas de fusión recombínate, puesto que estos contrarrestarán la vida media corta de la endostatina, que actualmente es una limitación de la terapia potencial de la endostatina. También se pueden emplear combinaciones con, o formas dirigidas de, activador de plasminógeno de tejido (tPA).

Las ventajas adicionales de los productos terapéuticos humanos de la presente invención incluyen la capacidad para disminuir la presión intersticial. Puesto que la permeabilidad incrementada, mediada por VEGF,

contribuye a la presión intersticial, la señalización reducida mediante VEGFR2 reducirá tanto la permeabilidad como la presión intersticial. Esto a su vez reducirá la barrera a fármacos que atraviesan la totalidad del tejido tumoral, de modo que se puedan aniquilar las células tumorales distantes de la vasculatura. También se puede lograr terapia prolongada puesto que las presentes composiciones no tienen o tienen una inmunogenicidad insignificante o baja.

B3. Secuencias de CRD de Anticuerpo

El término "variable", como se usa en la presente en referencia a los anticuerpos, significa que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos, y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a todo lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados "regiones hipervariables", tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada.

Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman la región menos variable (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno, cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), adoptando mayormente una configuración de β-hoja, conectada por tres regiones hipervariables, que forman asas que se conectan, y en algunos casos, forman parte de, la estructura de β-hoja.

Las regiones hipervariables en cada cadena se

mantienen conjuntamente en proximidad cercana por las FR, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (Kabat et al., 1991, incorporada específicamente en la presente como referencia). Los dominios constantes no están comprendidos directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tal como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

El término "región hipervariable", como se usa en la presente, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables para la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y residuos 31-35 (H1), 50-56 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., 1991, específicamente incorporada en la presente como referencia) y/o aquellos residuos de una "asa hipervariable" (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada). Los residuos "Menos variables" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable como se define en la presente.

Las secuencias de ADN y de aminoácidos deducida de las cadenas VH y VL del fragmento ScFv de r84 se proporcionan en la presente como SEQ ID NO: 1 (VH, ácido

nucleico), SEQ ID NO: 2 (VL, ácido nucleico) SEQ ID NO: 3 (VH, aminoácidos) y SEQ ID NO: 4 (VL, aminoácidos). Las secuencias de ADN de las cadenas VH y VL de la IgG de longitud completa de r84 se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 26 (VH, ácido nucleico) y SEQ ID NO: 27 (VL, ácido nucleico). Estas secuencias abarcan CDR1-3 de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo.

Como se describe en la presente (Sección C7), con la provisión de información estructural y funcional para una molécula biológica, se puede generar una variedad de moléculas equivalentes, o aún mejoradas. Esto aplica a los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención, como se ejemplifica por el anticuerpo r84. Aunque se deben conservar las propiedades de unión a antígeno y otras funcionales de un anticuerpo, existe un grado extremadamente alto de conocimiento en la técnica al producir anticuerpos equivalentes y aún mejorados una vez que se ha provisto un anticuerpo de referencia. Esta habilidad técnica se puede aplicar, en vista de las secuencias y de la información proporcionada en la presente, a la producción de anticuerpos adicionales que tienen características iguales, mejoradas o de otro modo deseables.

Para anticuerpos equivalentes, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en las regiones menos variables de dominio constante o variable del anticuerpo sin pérdida apreciable de capacidad interactiva de unión. Se prefiere que estos cambios se

hagan en las secuencias de ADN que codifican para las porciones de anticuerpo y que los cambios sean de naturaleza conservadora (ver Sección C7, la información de codones en la Tabla A, y los detalles técnicos de soporte en la mutagénesis específica del sitio). De manera natural, existe un límite al número de cambios que se deben hacer, pero esto será bien conocido por los expertos en la técnica.

Otros tipos de variantes son anticuerpos con propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo de origen del cual se generaron. Estas variantes, o compuestos de segunda generación, son típicamente variantes de sustitución que comprenden uno o más residuos sustituidos de región hipervariable de un anticuerpo de origen. Una manera conveniente para generar estas variantes de sustitución es maduración por afinidad usando visualización en fagos.

En la maduración por afinidad usando visualización en fagos, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se presentan de una manera monovalente de las partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 envasado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fago entonces se examinan para su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se describe en la presente. A fin de identificar sitios candidatos de región hipervariable para modificación, se puede realizar

la mutagénesis de exploración de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen de manera significativa a la unión al antígeno.

De manera alteARNtiva, o adicionalmente, se contempla que la estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo se delinee y analice para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y VEGF. Estos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución. Una vez que se generan estas variantes, el panel de variantes se somete a examen, como se describe en la presente, y se seleccionan para desarrollo adicional los anticuerpos con propiedades análogas pero diferentes o aún superiores en uno o más ensayos pertinentes.

Los aspectos adicionales de la invención se refieren por lo tanto a segmentos aislados o purificados de ADN y vectores recombinantes que codifican para las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, de la invención, tal como las cadenas pesada y ligera de r84, y la creación y uso de células hospedadoras recombinantes a través de la aplicación de tecnología de ADN, que expresan estas regiones CDR.

La presente invención se refiere de esta manera a segmentos de ADN humanos o sintéticos, que están libres de ADN genómico total y son capaces de expresar regiones CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, de la invención, tal como las cadenas pesada y/o ligera de r84. Como se usa en la presente, el término "segmento de ADN" se refiere a una

molécula de ADN que se ha aislado o purificado libre de ADN genómico total de una especie particular. Incluidos dentro del término "segmento de ADN", están los segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de estos segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares.

De manera similar, un segmento de ADN que comprende un segmento codificante o porción de gen aislada o purificada que codifica para las regiones CDR purificadas de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención, tal como las cadenas pesada y/o ligera de r84, se refiere a un segmento de ADN que incluye estas secuencias codificantes, y en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas o purificadas sustancialmente de otros genes que se presentan de manera natural o de secuencia que codifican para proteínas. A este respecto, el término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una unidad codificadora funcional de proteína, polipéptido o péptido. Como se entenderá por los expertos en la técnica, este término funcional incluye las secuencias nativas que codifican para el anticuerpo y los segmentos más pequeños creados por ingeniería que expresa, o se pueden adaptar para expresar, péptidos, polipéptidos o proteínas de unión a antígeno.

"Aislado o purificado sustancialmente de otras secuencias codificantes" significa que el segmento codificante o porción génica aislada de interés forma la parte significativa de la región codificante del segmento

de ADN, y que el segmento de ADN no contiene grandes porciones de ADN codificante que se presente de manera natural, tal como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de cADN. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN como originalmente se aísla, y no excluye genes o regiones codificantes adicionadas posteriormente al segmento por la mano del hombre.

En modalidades particulares, la invención se refiere a segmentos codificantes aislados o purificados o porciones génicas aisladas o purificadas y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican para regiones CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, de la invención, tal como cadenas pesada y/o ligera de r84, que comprenden al menos una primera región de secuencia que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, de manera más preferente, al menos aproximadamente 80 % de manera más preferente, al menos aproximadamente 85 %, de manera más preferente, al menos aproximadamente 90 % y de manera más preferente, al menos aproximadamente 95 % o un poco más o menos de identidad de secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; en donde las regiones CDR mantienen al menos sustancialmente las propiedades biológicas de las regiones CDR de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Como se describe en la presente, las secuencias pueden comprender ciertos aminoácidos equivalentes

biológicamente funcionales o "sustituciones conservadoras". Otras secuencias pueden comprender aminoácidos no funcionalmente equivalentes o "sustituciones no conservadoras" deliberadamente creadas por ingeniería para mejorar las propiedades de la CDR o anticuerpo que contiene la CDR, como se conoce por los expertos en la técnica y se describe adicionalmente en la presente.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico pueden incluir residuos adicionales, tal como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias 5' ó 3', y corresponder aún a una secuencia de la invención, en tanto que la secuencia cumpla con los criterios expuestos anteriormente, que incluyen preferentemente el mantenimiento o mejora de la actividad de la proteína biológica donde se atañe la expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales incluye varias secuencias no codificantes que flanquean ya sea las porciones 5' ó 3' de la región codificante, y también regiones de control.

Los segmentos de ácido nucleico de la presente invención se pueden combinar de esta manera con otras secuencias de ADN, tal como promotores, señales de poliadenilación, sitios adicionales de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otras secuencias codificantes, y similares, tal que su longitud total pueda variar de manera considerable. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, con la longitud total que se limite preferentemente por la facilidad de preparación y por el

uso en el protocolo propuesto de ADN recombinante.

Por lo tanto, los vectores recombinantes forman aspectos adicionales de la presente invención. Se contempla que los vectores particularmente útiles sean aquellos vectores en los cuales la porción codificante del segmento de ADN esté colocada bajo el control de un promotor. En general, aunque de manera no exclusiva, se empleará un promotor recombinante o heterólogo, es decir, un promotor normalmente no asociado con las secuencias codificantes en su ambiente natural. Estos promotores pueden incluir promotores bacterianos, virales, eucarióticos y mamíferos, en tanto que el promotor dirija efectivamente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula, organismo o aún animal, elegido para la expresión.

El uso del promotor y de las combinaciones tipo célula para la expresión de proteínas se conoce por los expertos en la técnica de biología molecular. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, o inducibles, o se pueden usar bajo las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

La expresión de las secuencias de ácido nucleico de la invención se puede lograr de manera conveniente por cualquiera o cualesquiera de las técnicas normales conocidas por los expertos en la técnica y descritas adicionalmente en la presente. Por ejemplo, la descripción

posterior de la expresión recombinante de proteínas de fusión aplica igualmente bien a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que no están operativamente asociados con otra secuencia codificante al nivel de ácido nucleico.

B4. Anticuerpos de Bibliotecas de Fagómidos

La tecnología recombinante ahora permite la preparación de anticuerpos que tienen la especificidad deseada de genes recombinantes que codifican para una variedad de anticuerpos (Van Dijk et al., 1989, incorporada en la presente como referencia). Ciertas técnicas recombinantes comprenden el aislamiento de genes de anticuerpo por selección inmunológica de bibliotecas combinatorias de expresión de fagos de inmunoglobulina, preparadas de ARN aislado del bazo de un animal inmunizado (Morrison et al., 1986; Winter y Milstein, 1991; cada una incorporada en la presente como referencia).

Para estos métodos, se preparan bibliotecas combinatorias de fagómidos de inmunoglobulina a partir de ARN aislado del bazo del animal inmunizado, y fagómidos que expresan anticuerpos apropiados se seleccionan por adsorción usando células que expresan el antígeno y células de control. Las ventajas de este planteamiento con respecto a las técnicas convencionales de hibridoma son que se pueden producir aproximadamente $10^4$ veces de tantos anticuerpos y examinar en una ronda única, y que se generan nuevas especificidades por la combinación de cadena H y L, que incrementa adicionalmente el porcentaje de anticuerpos apropiados, generados.

Un método para la generación de un gran

repertorio de diversas moléculas de anticuerpo en bacterias utiliza el bacteriófago lambda como el vector (Huse et al., 1989; incorporada en la presente como referencia). La producción de anticuerpos usando el vector lambda comprende la clonación de poblaciones de cadena pesada y ligera de secuencias de ADN en vectores separados de inicio. Los vectores se combinan de manera subsiguiente de manera aleatoria para formar un vector único que dirige la co-expresión de cadenas pesada y ligera para formar fragmentos de anticuerpo. Las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera se obtienen por amplificación, preferentemente por PCR[MR] o una técnica relacionada de amplificación, del mARN aislado de las células del bazo (o hibridomas del mismo) de un animal que se ha inmunizado con un antígeno seleccionado. Las secuencias de cadena pesada y ligera se amplifican típicamente usando cebadores que incorporan sitios de restricción en los extremos del segmento amplificado de ADN para facilitar la clonación de los segmentos de cadena pesada y ligera en los vectores de inicio.

Otro método para la generación y selección de bibliotecas grandes de sitios de combinación de anticuerpos completa o parcialmente sintéticos, o paratopos, utiliza vectores de visualización derivados del fago filamentoso tal como M13, fl o fd. Estos vectores de visualización de fagos filamentosos, referidos como "fagómidos", producen grandes bibliotecas de anticuerpos monoclonales que tienen inmunoespecificidades diversas y novedosas. La tecnología usa un dominio ancla de membrana de proteína de cubierta de

fago filamentoso como un medio para enlazar gen-producto y el gen durante la etapa de montaje de la replicación del fago filamentoso, y se ha usado para la clonación y expresión de anticuerpos de bibliotecas combinatorias (Kang et al., 1991; Barbas et al., 1991; cada una incorporada en la presente como referencia).

Esta técnica general para la visualización de fagos filamentosos se describe en la patente de los Estados Unidos número 5,658,727, incorporada en la presente como referencia. En un caso más general, el método proporciona un sistema para la clonación y examen simultáneos de especificidades pre-seleccionadas de unión a ligando de los repertorios de genes de anticuerpo usando un sistema de vector único. El examen de los miembros aislados de la biblioteca para la capacidad pre-seleccionada de unión a ligando, permite la correlación de la capacidad de unión de una molécula expresada de anticuerpo con un medio conveniente para aislar el gen que codifica para el miembro de la biblioteca.

Se logra el enlace de la expresión y examen por la combinación de selección de objetivo de un polipéptido de fusión en el periplasma de una célula bacteriana para permitir el montaje de un anticuerpo funcional, y la selección de objetivo de un polipéptido de fusión sobre la cubierta de una partícula de fago filamentoso durante el montaje de fago para permitir el examen o selección conveniente del miembro de interés de la biblioteca. La selección de objetivo periplásmico se proporciona por la presencia de un dominio de señal de secreción en un

polipéptido de fusión. La selección de objetivo a una partícula de fago se proporciona por la presencia de un dominio ancla de membrana de proteína de cubierta de fago filamentoso (es decir, un dominio ancla de membrana derivado de cpIII o cpVIII) en un polipéptido de fusión.

La diversidad de una biblioteca combinatoria de anticuerpos, basada en fagos filamentosos, se puede incrementar por transposición de los genes de cadena pesada y ligera, al alterar una o más de las regiones determinantes de complementariedad de los genes clonados de cadena pesada de la biblioteca, o al introducir mutaciones aleatorias en la biblioteca por reacciones en cadena de la polimerasa propensa a error. Se describen métodos adicionales para el examen de bibliotecas de fagómidos en las patentes de los Estados Unidos números 5,580,717; 5,427,908; 5,403,484; y 5,223,409, cada una incorporada en la presente como referencia.

Se ha desarrollado otro método para el examen o selección de grandes bibliotecas combinatorias de anticuerpo, utilizando la expresión de poblaciones de diversas secuencias de cadena pesada y ligera en la superficie de un bacteriófago filamentoso, tal como M13, fl o fd (patente de los Estados Unidos número 5,698,426; incorporada en la presente como referencia). Se sintetizan dos poblaciones de secuencias diversas de cadena pesada (Hc) y ligera (Lc) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR$^{MR}$). Estas poblaciones se clonan en un vector separado basado en M13 que contiene elementos necesarios para la expresión. El vector de cadena pesada

contiene una secuencia de proteína de cubierta del gen VIII (gVIII) de modo que la traducción de las secuencias de cadena pesada produce las proteínas de fusión de gVIII-Hc. Las poblaciones de dos vectores se combinan al azar tal que sólo las porciones de vector que contienen las secuencias Hc y Lc se unen en un vector circular único.

El vector combinado dirige la co-expresión tanto de secuencia Hc como Lc para el montaje de los dos polipéptidos y la expresión superficial en M13 (patente de los Estados Unidos número 5,698,426; incorporada en la presente como referencia). El paso de combinación junta al azar diferentes secuencias codificantes de Hc y Lc dentro de dos poblaciones diversas en un vector individual. Las secuencias de vector donadas de cada vector independiente son necesarias para la producción del fago viable. Además, puesto que las pseudo secuencias de gVIII están contenidas sólo en uno de los dos vectores de inicio, no se puede lograr la co-expresión de los fragmentos funcionales de anticuerpo como proteínas de fusión de gVIII-Hc asociadas a Lc en la superficie del fago hasta que las secuencias de vector se enlacen en el vector individual.

La expresión superficial de la biblioteca de anticuerpo se realiza en una cepa supresora ámbar. Un codón finalizador ámbar entre la secuencia de Hc y la secuencia de gVIII desenlaza los dos componentes en una cepa no supresora. El aislamiento del fago producido de la cepa no supresora y la infección de una cepa supresora enlazarán las secuencias de Hc a la secuencia de gVIII durante la expresión. El cultivo de la cepa supresora

después de la infección permite la co-expresión en la superficie de M13 de todas las especies de anticuerpo dentro de la biblioteca como proteínas de fusión de gVIII (proteínas de fusión de gVIII-Fab). De manera alteARNtiva, se puede aislar el ADN de la cepa no supresora y luego introducir en una cepa supresora para lograr el mismo efecto.

La biblioteca de expresión superficial se examina para fragmentos Fab específicos que se unen a moléculas preseleccionadas por procedimientos normales de aislamiento por afinidad. Estos métodos incluyen, por ejemplo, adsorción (Parmley y Smith, 1988; incorporada en la presente como referencia), cromatografía de afinidad y procedimientos de transferencia en fase sólida. La adsorción se prefiere, debido a que se examinan fácilmente altos títulos del fago, de manera rápida y en pequeños volúmenes. Adicionalmente, este procedimiento puede seleccionar especies de fragmentos Fab menores dentro de la población, que de otro modo habrían sido indetectables, y amplificar a poblaciones sustancialmente homogéneas. Los fragmentos de Fab seleccionados se pueden caracterizar al secuenciar los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos después de la amplificación de la población de fagos.

Otro método para producir diversas bibliotecas de anticuerpos y examen para las especificidades deseables de unión se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,667,988 y 5,759,817, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia. El método

comprende la preparación de bibliotecas de moléculas heterodiméricas de inmunoglobulina en la forma de bibliotecas de fagómidos usando oligonucleótidos degenerados y reacciones de extensión de cebadores para incorporar las degeneraciones en las regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera, variables de inmunoglobulina, y la visualización de los péptidos mutagenizados en la superficie del fagómido. Posteriormente, la proteína de visualización se examina para la capacidad para unirse a un antígeno preseleccionado.

El método para producir una molécula heterodimérico de inmunoglobulina comprende en general (1) introducir un gen codificante de región V de cadena pesada o ligera, de interés, en el vector de visualización de fagómido; (2) introducir un sitio de unión aleatorizada en el vector de la proteína de visualización de fagómido por extensión de cebador con un oligonucleótido que contiene regiones de homología a una CDR del gen de la región V de anticuerpo y que contiene regiones de degeneración para producir secuencias codificantes aleatorizadas para formar una población grande de vectores de visualización cada uno capaz de expresar diferentes sitios putativos de unión visualizados en una proteína de visualización de superficie de fagómido; (3) expresar la proteína de visualización y el sitio de unión en la superficie de una particular de fago filamentoso; y (4) aislar (seleccionar) la partícula de fago expresado en superficie usando técnicas de afinidad tal como adsorción de partículas de fago contra un antígeno

preseleccionado, aislando de este modo una o más especies de fagómidos que contienen una proteína de visualización que contiene un sitio de unión que se une a un antígeno preseleccionado.

En la patente de los Estados Unidos número 5,702,892, incorporada en la presente como referencia, se describe una variación adicional de este método para producir bibliotecas diversas de anticuerpos y selección para especificidades deseables de unión. En este método, se emplean sólo secuencias de cadena pesada, las secuencias de cadena pesada se aleatorizan en todas las posiciones de nucleótido que codifican ya sea para región hipervariable CDRI o CDRIII, y la variabilidad genética en las CDR se genera independiente de cualquier proceso biológico.

En el método, se crean por ingeniería dos bibliotecas para transponer genéticamente motivos de oligonucleótido dentro de la región menos variable de la estructura genética de cadena pesada. A través de la mutación aleatoria ya sea de CDRI o CDRIII, se reconstruyeron las regiones hipervariables del gen de cadena pesada para dar por resultado una colección de secuencias altamente diversas. Las proteínas de cadena pesada codificadas por la colección de secuencias génicas mutadas poseyeron el potencial de tener todas las características de unión de una inmunoglobulina en tanto que sólo requieren una de las dos cadenas de inmunoglobulina.

De manera específica, el método se practica en la ausencia de la proteína de cadena ligera de

inmunoglobulina. Se incuba una biblioteca de proteínas de cadena pesada, modificadas, que presentan el fago, con un ligando inmovilizado para seleccionar clones que codifican para proteínas recombinantes que se unen de manera específica al ligando inmovilizado. El fago unido entonces se disocia del ligando inmovilizado y se amplifica por crecimiento en células hospedadoras bacterianas. Las placas virales individuales, cada una que expresa una diferente proteína recombinante, se expanden, y entonces se valoran los clones individuales para la actividad de unión.

B5. Ratones Transgénicos que Contienen Bibliotecas de Anticuerpos Humanos

Ahora está disponible tecnología recombinante para la preparación de anticuerpos. Además de las bibliotecas combinatorias de expresión de fagos de inmunoglobulina, descritas anteriormente, otro planteamiento de clonación molecular es preparar anticuerpos de ratones transgénicos que contienen bibliotecas de anticuerpos humanos. Estas técnicas se describen en la patente de los Estados Unidos número 5,545,807, incorporada en la presente como referencia.

En un sentido más general estos métodos comprenden la producción de un animal transgénico que tiene insertado en su material genético de línea germinal que codifica para menos parte de una inmunoglobulina de origen humano o que puede rearreglarse para codificar para un repertorio de inmunoglobulinas. El material genético insertado se puede producir de una fuente humana, o se puede producir de manera sintética. El material puede

codificar para al menos parte de una inmunoglobulina conocida o se puede modificar para codificar para al menos parte de una inmunoglobulina alterada.

El material génico insertado se expresa en el animal transgénico, dando por resultado la producción de una inmunoglobulina derivada al menos en parte del material genético insertado de inmunoglobulina humana. Se encuentra que el material genético se rearregla en el animal transgénico de modo que se puede producir un repertorio de inmunoglobulinas con parte o partes derivadas de material genético insertado, aún si el material genético insertado se incorpora en la línea germinal en la posición errónea o con la geometría errónea.

El material genético insertado puede estar en la forma de ADN clonado en vectores procarióticos tal como plásmidos y/o cósmidos. Se insertan fragmentos más grandes de ADN usando vectores artificiales de cromosoma de levadura (Burke et al., 1987; incorporada en la presente como referencia), o por introducción de fragmentos de cromosoma (Richer y Lo, 1989; incorporada en la presente como referencia). El material genético insertado se puede introducir al hospedador de una manera conveniente por ejemplo por inyección u otros procedimientos en huevos fertilizados o células madre embriónicas.

En aspectos preferidos, se utiliza un animal hospedador que inicialmente no tiene el material genético que codifica para regiones constantes de inmunoglobulina, de modo que el material transgénico resultante usará solo el material genético humano insertado cuando se produzcan

inmunoglobulinas. Esto se puede lograr ya sea al usar un hospedador mutante que se presenta de manera natural que carece del material genético pertinente, o al hacer artificialmente mutantes, por ejemplo, en líneas celulares finalmente para crear un hospedador del cual se ha removido el material genético pertinente.

Donde el animal hospedador tiene material genético que codifica para regiones constantes de inmunoglobulina, el animal transgénico tendrá el material genético que se presenta de manera natural y el material genético insertado y producirá inmunoglobulinas derivadas del material genético que se presenta de manera natural, del material genético insertado, y de mezclas de ambos tipos de material genético. En este caso, la inmunoglobulina deseada se puede obtener al seleccionar hibridomas derivados del animal transgénico, por ejemplo, al aprovechar el fenómeno de exclusión alélica de expresión génica de anticuerpos o pérdida diferencial de cromosomas.

Una vez que se ha preparado un animal transgénico adecuado, el animal simplemente se inmuniza con el inmunógeno deseado. Dependiendo de la naturaleza del material insertado, el animal puede producir una inmunoglobulina quimérica, por ejemplo, de origen de ratón/humano mezclado, donde el material genético de origen extraño codifica solo para parte de la inmunoglobulina; o el animal puede producir una inmunoglobulina completamente extraña, por ejemplo, de origen completamente humano, donde el material genético de origen extraño codifica para una inmunoglobulina completa.

Se pueden producir antisueros policlonales a partir del animal transgénico después de la inmunización. Se pueden remover células productoras de inmunoglobulina del animal para producir la inmunoglobulina de interés. De manera preferente, se producen anticuerpos monoclonales del animal transgénico, por ejemplo, al fusionar células de bazo del animal con células de mieloma y al seleccionar los hibridomas resultantes para seleccionar aquellos que producen el anticuerpo deseado. Se describen en la presente las técnicas adecuadas para estos propósitos.

En un planteamiento alteARNtivo, el material genético se puede incorporar en el animal de una mantera tal que el anticuerpo deseado se produzca en fluidos corporales tal como secreciones serosas o exteARNs del animal, tal como leche, calostro o saliva. Por ejemplo, al insertar material genético *in vitro* que codifica para al menos parte de una inmunoglobulina humana en un gen de un mamífero que codifica para una proteína láctea y luego al introducir el gen a un huevo fertilizado del mamífero, por ejemplo, por inyección, el huevo puede desarrollarse en un mamífero hembra adulto que produzca leche que contenga inmunoglobulina derivada al menos en parte del material genético insertado de inmunoglobulina humana. El anticuerpo deseado entonces se puede recolectar de la leche. Por los expertos en la técnica se conocen las técnicas adecuadas para llevar a cabo estos procesos.

Los animales transgénicos anteriores usualmente se emplean para producir anticuerpos humanos de un isotipo individual de manera más específica un isotipo que es

esencial para la maduración de células B, tal como IgM y posiblemente IgD. Otro método preferido para producir anticuerpos humanos anti-VEGF es usar la tecnología descrita en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; y 5,770,429; cada una incorporada en la presente como referencia, en donde se describen animales transgénicos que son capaces de cambiar de un isotipo necesario para el desarrollo de células B a otros isotipos.

En el desarrollo de un linfocito B, la célula produce inicialmente IgM con una especificidad de unión determinada por las regiones $V_H$ y $V_L$ productivamente rearregladas. De manera subsiguiente, cada célula B y sus células de progenie sintetizan anticuerpos con las mismas regiones V de cadena L y H, pero puede cambiar el isotipo de la cadena H. El uso de regiones constante mu o delta se determina en su mayor parte por empalme alteARNtivo, que permite que IgM e IgD se co-expresen en una célula individual. Los otros isotipos de cadena pesada (gamma, alfa, y épsilon) se expresan solo de manera nativa después de que un evento de arreglo génico suprime los exones C-mu y C-delta. Este proceso de rearreglo génico, llamado cambio de isotipo, se presenta típicamente por recombinación entre los llamados segmentos de cambio localizados inmediatamente en la dirección 5' de cada gen de cadena pesada (excepto delta). Los segmentos de cambio individuales están entre 2 y 10 kb de longitud y consisten principalmente de secuencias repetidas, cortas.

Por estas razones, se prefiere que los transgenes

incorporen secuencias reguladoras transcripcionales dentro de aproximadamente 1-2 kb en la dirección 5' de cada región de cambio que se va a utilizar para el cambio de isotipo. Estas secuencias reguladoras transcripcionales incluyen preferentemente un promotor y un elemento intensificado, y de manera más preferente incluyen la región flanqueadora 5' (es decir, en la dirección 5') que está asociada de manera natural (es decir, que se presenta en la configuración de línea germinal) con una región de cambio. Aunque una secuencia flanqueadora 5' de una región de cambio se puede enlazar de manera operable a una diferente región de cambio para la construcción del transgen, en algunas modalidades, se prefiere que cada región de cambio incorporada en la construcción de transgen tenga la región flanqueadora 5' que se presenta inmediatamente en la dirección 5' en la configuración de línea germinal que se presenta de manera natural. Se conoce la información de secuencia que se refiere a secuencias de región de cambio de inmunoglobulina (Mills et al., 1990; Sideras et al., 1989; cada una incorporada en la presente como referencia).

En el método descrito en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; y 5,770,429, los transgenes de inmunoglobulina humana contenidos dentro del animal transgénico funcionan correctamente a todo lo largo de la ruta de desarrollo de células B que conduce al cambio de isotipo. Por consiguiente, en este método estos transgenes se construyen para producir cambio de isotipo y uno o más de lo siguiente: (1) expresión de alto nivel y específica

del tipo de célula (2) rearreglo génico funcional, (3) activación de y respuesta a exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente (5) transducción de señal, (6) hipermutación somática, y (7) dominación del locus de anticuerpo de transgen durante la respuesta inmunitaria.

Un requisito importante para la función del transgen es la generación de un repertorio de anticuerpos primarios que es suficientemente diverso para activar una respuesta inmunitaria secundaria para una amplia variedad de antígenos. El gen rearreglado de cadena pesada consiste de un exón de péptido de señal, un exón de región variable y un arreglo en tándem de regiones constantes de múltiple dominio, cada una de las cuales se codifica por varios exones. Cada uno de los genes de región constante codifica para la porción constante de una clase diferente de inmunoglobulinas. Durante el desarrollo de las células B, se suprimen las regiones constantes próximas de la región V que conduce a la expresión de nuevas clase de cadena pesada. Para cada clase de cadena pesada, los patrones alteARNtivos de empalme de ARN dan lugar a inmunoglobulinas transmembrana y segregadas.

El locus de cadena pesada humana consiste de aproximadamente 200 segmentos génicos V que abarcan 2 Mb, aproximadamente 30 segmentos génicos D que abarcan aproximadamente 40 kb, seis segmentos J agrupados dentro de un intervalo de 3 kb, y nueve segmentos génicos de región constante extendidos sobre aproximadamente 300 kb. El locus completo abarca aproximadamente 2.5 Mb de la porción

distantes del brazo largo del cromosoma 14. Los fragmentos de transgen de cadena pesada que contienen los miembros de las seis de las familias $V_H$ conocidas, los segmentos génicos de D y J, así como las regiones constantes mu, delta, gamma 3, gamma 1 y alfa 1 se conocen (Berman et al., 1988; incorporada en la presente como referencia). De manea similar se construyen fragmentos genómicos que contiene todos los segmentos génicos necesarios y las secuencias reguladoras de un locus de cadena ligeras humana.

La expresión de transgenes pesados y ligeros exitosamente rearreglados de inmunoglobulina tiene usualmente un efecto dominante al suprimir el rearreglo de los genes endógenos de inmunoglobulina en el animal no humano transgénico. Sin embargo, en ciertas modalidades, es deseable efectuar la inactivación completa de locus Ig endógeno de modo que no se puedan formar cadenas híbridas de inmunoglobulina que comprendan una región variable humana y una región constante no humana (por ejemplo, murina), por ejemplo por trans-cambio entre las secuencias Ig endógenas y de transgen. Usando tecnología de células madre embriónicas y recombinación homóloga, se puede eliminar fácilmente el repertorio endógeno de inmunoglobulina. Además, se puede lograr la supresión de genes Ig endógenos usando una variedad de técnicas tal como tecnología antisentido.

En otros aspectos de la invención puede ser deseable producir una inmunoglobulina trans-cambiada. Los anticuerpos que comprenden estas inmunoglobulinas quiméricas trans-cambiadas se pueden usar para una variedad

de aplicaciones donde es deseable tener una región constante no humana (por ejemplo, murina), por ejemplo, para retención de funciones efectoras en el hospedador. La presencia de una región constante murina puede dar ventajas con respecto a una región constante humana, por ejemplo, para proporcionar funciones efectoras murinas (por ejemplo, ADCC, fijación de complemento murino) tal que este anticuerpo quimérico se pueda probar en un modelo de enfermedad de ratón. Subsiguiente a la prueba animal, se puede aislar la secuencia que codifica para la región variable humana, por ejemplo, por amplificación por PCR$^{MR}$ o clonación de cADN de la fuente (clon de hibridoma), y empalmar a una secuencia que codifique para una región constante humana deseada para codificar región constante humana deseada para codificar para un anticuerpo de secuencia humana más adecuado para uso terapéutico humano.

B6. Mutagénesis por PCR$^{MR}$

La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil en la preparación de anticuerpos individuales a través de mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica proporciona además una fácil capacidad para preparar y probar variantes de secuencia, que incorporan una o más de las consideraciones anteriores, ya sea humanización o no, al introducir uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en el ADN.

Aunque muchos métodos son adecuados para el uso en mutagénesis, en general ahora se prefiere el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR$^{MR}$). Esta tecnología ofrece un rápido y eficiente método para introducir

mutaciones deseadas en una secuencia dada de ADN. El siguiente texto describe de manera particular el uso de PCR[MR] para introducir mutaciones puntuales en una secuencia, como se puede usar para cambiar el aminoácido codificado por una secuencia determinada.

También son adecuadas las adaptaciones de este método para introducir sitos de enzima de restricción en una molécula de ADN.

En este método, se diseñan oligonucleótidos sintéticos para incorporar una mutación puntual en un extremo de un segmento amplificado. Después de la PCR[MR], los fragmentos amplificados se hacen de extremos romos al tratar con fragmentos Klenow, y los fragmentos de extremos romos entonces se ligan y sub-clonan en un vector para facilitar el análisis de secuencia.

Para preparar el ADN de plantilla que uno desea mutagenizar, el ADN se subclona en un vector de alto número de copia, tal como pUC19, usando sitios de restricción que flanquean el área que se va a mutar. Entonces se preparar el ADN de plantilla usando una miniprep plasmídica. Los cebadores apropiados de oligonucleótido que se basan en la secuencia de origen, pero que contienen la mutación puntual deseada y que se flanean en el extremo 5' por un sitio de enzima de restricción, se sintetizan usando un sintetizador automatizado. En general, se requiere que el cebador sea homólogo al ADN de plantilla por aproximadamente 15 bases o poco más o menos. Los cebadores se pueden purificar por electroforesis en gel de poliacrilamida desaturalizante, aunque esto no es absolutamente necesario para el uso en

PCR$^{MR}$. El extremo 5' de los oligonucleótidos entonces se debe fosforilar.

El ADN de plantilla se debe amplificar por PCR$^{MR}$, usando los cebadores de oligonucleótido que contienen las mutaciones puntuales deseadas. La concentración de $MgCl_2$ en el amortiguador de amplificación en general será de aproximadamente 15 mM. En general se deben llevar a cabo aproximadamente 20-25 ciclos de PC$^{MR}$ como sigue: desnaturalización, 35 segundos a 95°C; hibridización 2 minutos a 50°C; y extensión, 2 minutos a 72°C. La PCR$^{MR}$ incluirá en general una última extensión de ciclo de aproximadamente 10 minutos a 72°C. Después del paso final de extensión, se deben adicionar aproximadamente 5 unidades de fragmentos Klenow a la mezcla de reacción e incubar durante 15 minutos adicionales a aproximadamente 30°C. La actividad de exonucleasa de los fragmentos Klenow se requiera para hacer los extremos al ras y adecuados para la clonación de extremos romos.

La mezcla de reacción resultante se debe analizar en general por electroforesis en gel de agarosa o acrilamida no desnaturalizante para verificar que la amplificación haya producido el producto previsto. Entones se procesará la mezcla de reacción al remover la mayoría de los aceites minerales, extrayendo con cloroformo para remover el aceite restante, extrayendo con fenol amortiguado y luego concentrando con precipitación con 100 % de etanol. Entonces, se debe digerir aproximadamente la mitad de los fragmentos amplificados con una enzima de restricción que corta en las secuencias flanqueadoras

usadas en los oligonucleótidos. Los fragmentos digeridos se purifican en un gel de agarosa de baja formación de geles/bajo punto de fusión.

Para subclonar los fragmentos y para verificar la mutación puntual, se cubclonarán los dos fragmentos amplificados en un vector apropiadamente digerido por ligación de extremo romos. Esto se usará para transformar *E. coli*, del cual se puede preparar de manera subsiguiente el ADN de plásmido usando una miniprep. La porción amplificada del ADN plasmídico entonces se analizará por secuenciación de ADN para confirmar que se generó la mutación puntual correcta. Esto es importante puesto que Taq-ADN-polimerasa puede introducir mutaciones adicionales en los fragmentos de ADN.

La introducción de una mutación puntual también puede afectarse usando pasos secuenciales de PCR$^{MR}$, en este procedimiento, los dos fragmentos que abarcan la mutación se fijan entre sí y se extienden por síntesis mutuamente cebada. Este fragmento entonces se amplifica por un segundo paso de PCR$^{MR}$, evitando de este modo la ligación de extremos romos requerida en el protocolo anterior. En este método, se realizan como se describe anteriormente la preparación del ADN de plantilla, la generación de los cebadores de oligonucleótido y la primera amplificación por PCR$^{MR}$. En este proceso, sin embargo, los oligonucleótidos elegidos deben ser homólogos al ADN de plantilla para un tramo de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 bases y también debe traslaparse entre sí por aproximadamente 10 bases o más.

En la segunda amplificación por PCR$^{MR}$, se usará cada fragmento amplificado y cada cebador de secuencia de flanqueo y se lleva la PCR$^{MR}$ durante entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 ciclos, usando las condiciones como se describe anteriormente. Nuevamente se subclonarán los fragmentos y se verificará que sea correcta la mutación puntual al usar los pasos resumidos anteriormente.

Al usar cualquiera de los métodos anteriores, en general se prefiere introducir la mutación al amplificar tantos fragmentos pequeños como sea posible. Por su puesto, los parámetros tal como la temperatura de fusión del oligonucleótido, puesto que en general se verá influenciado por el contenido de GC y la longitud del oligo, también se deben considerar de manera cuidadosa. La ejecución de estos métodos, y su optimización si en necesario, será bien conocida por el experto en la técnica y se describen adicionalmente en varias publicaciones tal como *Current Protocols in Molecular Biology, 1995*, incorporada en la presente como referencia.

Cuando se realiza la mutagénesis específica del sitio, se puede emplear la Tabla A como una referencia.

Tabla A

| Aminoácidos | | | codones |
|---|---|---|---|
| alanina | Ala | A | GCA GCC GCG GCU |
| Cisteína | Cys | C | UGC UGU |
| Ácido aspártico | Asp | D | GAC GAU |

| Aminoácidos | | | codones | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido glutámico | Glu | E | GAA | GAG | | | | |
| Fenilalanina, | Phe | F | UUC | UUU | | | | |
| Glicina | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU | | |
| Histidina | His | H | CAC | CAU | | | | |
| Isoleucina | Ile | I | AUA | AUC | AUU | | | |
| Glicina | LyS | K | AAA | AAG | | | | |
| Leucina, | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| Metionina | Met | M | AUG | | | | | |
| Asparagina | Asn | N | AAC | AAU | | | | |
| Prolina | PrO | P | CCA | CCC | CCG | CCU | | |
| Glutamina | Gln | Q | CAA | CAG | | | | |
| Arginina | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| Serina | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| Treonina | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU | | |
| Valina | VAL | V | GUA | GUC | GUG | GUU | | |
| Triptófano | Trp | W | UGG | | | | | |
| Tirosina | Tyr | Y | UAC | UAU | | | | |

B7. Fragmentos y Derivados de Anticuerpo

A pesar de la fuente del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 original de la invención, se puede usar en la presente invención ya sea el anticuerpo intacto, multímeros de anticuerpo, o cualquiera de una variedad de regiones funcionales de unión a antígeno del anticuerpo. Las regiones funcionales de ejemplo incluyen fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab', Fab, $F(ab')_2$, anticuerpos de dominio individual (DAB), dímero de TandAb, Fv, scFv (Fv de cadena individual), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y similares. Estas técnicas para

preparar estas construcciones son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen adicionalmente en la presente.

La elección de la construcción anticuerpo se puede ver influenciada por varios factores. Por ejemplo, la vida media prolongada puede resultar de la readsorción activa de anticuerpos intactos dentro del riñón, una propiedad de la pieza Fc de inmunoglobulina. Por lo tanto, se espera que los anticuerpos basados en IgG exhiban menor depuración sanguínea que sus contrapartes de Fab'. Sin embargo, las composiciones basadas en el fragmento Fab' exhibirán en general mejor capacidad de penetración de tejido.

Si se desea, se pueden seleccionar regiones Fc particulares para proporcionar longevidad. Por ejemplo, ver WO 99/43713, que se refiere a dominios constante con vidas medias mejoradas en circulación logradas por unión sustancialmente reducida a los receptores de Fcγ, FcγRI, FcγRII y FcγRIII (Fridman, 1991). Adicionalmente, la Patente de los Estados Unidos No. 7,083,784 se refiere a dominios constantes modificados con vidas media *in vivo* incrementadas que resultan de las modificaciones que incrementan su afinidad para el FcRn (receptor Fc neonatal). Las técnicas de la Patente de los Estados Unidos No. 7,083,784 se pueden aplicar para crear anticuerpos con mejor longevidad, ya sea con o sin funciones efectoras sustanciales.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpo por proteólisis de la inmunoglobulina humana completa por la

tiol-proteasa no específica, papaína. La digestión con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados "fragmentos Fab", cada uno con un sitio individual de unió a antígeno, y un "fragmento Fc" residual.

Primero se debe activar la papaína al reducir el grupo sulfhidrilo en el sitio activo con cisteína, 2-mercaptoetanol o ditiotreitol. Se deben remover metales pesados en la enzima concentrada por quelación con EDTA (2 mM) para asegurar actividad enzimática mínima. Normalmente se mezclan conjuntamente la enzima y el substrato en la relación de 1:100 en peso. Después de la incubación. La reacción se puede detener por alquilación irreversible del grupo tiol con yodoacetamina o simplemente por diálisis. La terminación de la digestión se debe monitorizar por SDS-PAGE y las varias fracciones se separan por cromatografía de proteína A-Sefarosa o intercambio iónico.

El procedimiento usual para la preparación de fragmentos $F(ab')_2$ a partir de IgG de origen humano es proteólisis limitada por la enzima pepsina. Las condiciones, 100x de exceso p/p de anticuerpo en amortiguador de acetato a pH 4.5, 37°C, sugiere que el anticuerpo se escinde en el lado C-terminal del enlace de disulfuro inter-cadena pesadas. Las velocidades de digestión de IgG de ratón pueden variar con la subclase y se deben elegir condiciones para evitar cantidades significativas de IgG completamente degrada. En particular, la $IgG_{2b}$ es susceptible a degradación completa. Las otras clases requieren diferentes condiciones de incubación para

producir resultados óptimos, todos los cuales se conocen en la técnica.

El tratamiento con pepsina de anticuerpos intactos produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno. Las condiciones de ejemplo para la digestión de IgG por pepsina requieren condiciones que incluyen diálisis en un amortiguador de acetato 0.1 M, pH 4.5, y luego incubación durante cuatro horas con 1 % p/p de pepsina; la digestión de $IgG_1$ y $IgG_{2a}$ se mejora si se dializa primero contra amortiguador de formiato 0.1 M, pH 2.8, a 4°C, durante 16 horas seguido por amortiguador de acetato. $IgG_{2b}$ da resultados más consistentes con incubación en V8-proteasa estafilococal (3 % p/p) en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.8, durante cuatro horas a 37°C.

Un fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer domino constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de uno pocos residuos en el término carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región de articulación de anticuerpo. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo se produjeron de manera original como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de articulación entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpo.

Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste de un

dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en fuerte asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero $V_H$-$V_L$. De manera colectiva, las seis regiones hipervariables (CDR) confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un dominio variable individual (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables (CDR) específicas para un antígeno) tienen la capacidad para reconocer y unirse al antígeno.

Los fragmentos "Fv de cadena individual" o "sFv" o "scFv" de anticuerpo comprenden los dominios $V_H$ y $V_L$ de anticuerpo en donde estos dominios se presentan en una cadena única de polipéptido. En general, el polipéptido de Fv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios $V_H$ y $V_L$ que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno.

Las siguientes patentes se incorporan específicamente en la presente como referencia para los propósitos complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y el uso de regiones funcionales de unión a antígeno de los anticuerpos, que incluyen los fragmentos scFv, Fv, Fab', Fab y $F(ab')_2$, de los anticuerpos anti-VEGF: Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,855,866; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555; 5,877,289; y 6,093,399. La WO 98/45331 también se incorporada en la presente como referencia para los propósitos que incluyen describir y enseñar aún

adicionalmente la preparación de regiones variables, hipervariables y determinantes de complementariedad (CDR) de anticuerpos.

Los "diacuerpos" son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable ($V_H$) de cadena pesada conectado a un dominio variable ($V_L$) de cadena ligera en la misma cadena de polipéptido ($V_H$ - $V_L$). Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se forzan a los dos dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen en EP 404,097 y WO 93/11161. Los "anticuerpos lineales", que pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H$-$C_H$1-$V_H$-$C_H$1) que forman un par de regiones de unión a antígeno, como se describe en Zapata et al. (1995).

Al usar un fragmento Fab' o de unió a antígeno de un anticuerpo, con los beneficios acompañantes en la penetración a tejido, puede derivarse ventajas adicionales de modificar el fragmento para incrementar su vida media. Se pueden emplear una variedad de técnica, tal como manipulación o modificación de la molécula misma del anticuerpo, y también conjugación a portadores inertes. Cualquiera conjugación para el único propósito de incrementar la vida media, en lugar de distribuir un agente a un objetivo, se debe planear cuidadosamente ya que los fragmentos Fab' y otros se eligen para penetrara tejidos. Sin embargo, se contempla la conjugación a polímeros no de

proteína, tal como PEG y similares.

Por lo tanto las modificaciones diferentes de la conjugación se basan en la modificación de la estructura del fragmento de anticuerpo para volverlo más estable, y/o para reducir la velocidad del catabolismo en el cuerpo. Un mecanismo para estas modificaciones es el uso de D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos. Aquellos expertos en la técnica entenderán que la introducción de estas modificaciones se necesita seguir por prueba rigorosa de la molécula resultante para asegurarse que aún retiene las propiedades biológicas deseadas. Las modificaciones estabilizadoras adicionales incluyen el uso de la adición de las moléculas estabilizadoras ya sea al N-término o el C-término o ambos, que en general se usa para prolongar la vida media de moléculas biológicas. Solo a manera de ejemplo, se pueden desear para modificar los términos por acilación o aminación.

Las modificaciones moderadas tipo conjugación para el uso con la presente invención incluyen incorporar un epítopo de unión a receptor de salvamento en el fragmento de anticuerpo. Las técnicas para lograr esto incluyen mutación de la región apropiada del fragmento de anticuerpo o incorporación del epítopo como una marca peptídica que se une al fragmento de anticuerpo. La WO 96/32478 se incorpora en la presente de manera específica por referencia para los propósitos de ejemplificar adicionalmente esta tecnología. Los epítopos de unión a receptor de salvamento son típicamente regiones de tres o más aminoácidos de una o dos asas del domino Fc que se

transfieren a la posición análoga en el fragmento de anticuerpo. Los epítopos de unión a receptor de salvamento de la WO 98/45331 se incorpora en la presente como referencia para el uso con la presente invención.

B8. Ensayos de Unión y Funcionales

Aunque la presente invención tiene utilidad significativa en regímenes de tratamiento de animales y humanos, también tiene muchos otros usos prácticos, incluyendo muchos usos *in vitro*. Ciertos de estos usos se relacionan a las propiedades específicas de unión de los anticuerpos humanos o inmunoconjugados. Ya que todos los compuestos de la invención incluyen al menos un componente de unión a VEGF, se pueden usar virtualmente en todas las modalidades de unión en las cuales se pueda usar cualquier anticuerpo anti-VEGF.

La presencia de un agente unido, donde es pertinente, aunque proporciona propiedades ventajosas, no anula la utilidad de las regiones de anticuerpo humano en un ensayo de unión. De manera adecuada, los ensayos útiles de unión incluyen de esta manera aquellos comúnmente empleados en al técnica, tal como inmunotransferencias, transferencias Western, transferencias de punto, RIA, ELISA, inmunohistoquímica, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y similares, como se describe adicionalmente en la presente.

Ciertos ensayos normales de unión son aquellos en los cuales se inmoviliza un antígeno sobre una matriz de soporte sólido, por ejemplo, nitrocelulosa, nailon o una

combinación de los mismos tal como en inmunotransferencias, transferencias Western y ensayos relacionados. Otros ensayos importantes son los ELISA. Todos estos ensayos se pueden adaptar fácilmente para el uso en la detección de VEGF, como se puede aplicar en la diagnosis de una enfermedad angiogénica. Los agentes de la invención también se pueden usar en unión tanto con bloques de tejido congelados en fresco, fijados en formalina e incrustados en parafina en inmunohistoquímica; en clasificación celular activadas por fluorescencia, sitometría de flujo o microfluorometría de flujo; en inmunoprecipitación; en modalidades de purificación de antígeno, tal como cromatografía de afinidad, incluyendo aún, en casos de anticuerpos biespecíficos, la purificación rápida de un paso de uno o más antígenos al mismo tiempo; y en muchos otros ensayos de unión que se conocerán por los expertos en la técnica dada la información presentadas en al presente.

Los usos prácticos adicionales de los presentes anticuerpos humanos son como controles en ensayos funcionales. Estos incluyen muchos ensayos y sistemas *in vitro* y *ex vivo*, así como estudios de modelos de animales. Puesto que las propiedades de unión y funcionales de los anticuerpos humanos de la invención son particularmente específicas, es decir, inhiben la unión de VEGF a y la señalización mediante VEGFR2, pero no VEGFR1, estos usos de "control" son actualmente sumamente valiosos. Los ensayos que se benefician de una aplicación práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo ensayos con respecto al

crecimiento de células endoteliales, mediado por VEGF, fosforilación inducida por VEGF y permeabilidad vascular inducida por VEGF así como el ensayo de microconcavidad corneal de neovascularización y el ensayo de membrana corio-alantoica de pollo (CAM). Estos sistemas de ensayo también se pueden desarrollar en ensayos *in vitro* o *ex vivo* de selección de fármacos, en donde la presente provisión de materiales biológicos con propiedades bien definidas es particularmente importante.

C. Inmunoconjugados

Aunque la presente invención proporciona anticuerpos humanos desnudos o no conjugados, sorprendentemente efectivos para el uso en métodos anti-angiogénicos, también se proporcionan de este modo inmunoconjugados, inmunotoxinas y coaguligandos de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadoras de VEGFR2. Los agentes actualmente preferidos para el uso en los conjugados terapéuticos de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 son agentes radioterapéuticos (como se ejemplifica por los radiodiagnósticos descritos en la presente), agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-tubulina, agentes anti-celulares o citotóxicos, citocinas, quimiocinas, inhibidores de ATPasa tipo V y coagulantes (factores de coagulación).

Para generar inmunoconjugados, inmunotoxinas y coaguligandos, se puede emplear expresión recombinante para crear una proteína de fusión, como se conoce por los expertos en la técnica y se describe adicionalmente en la

presente. Igualmente, se pueden generar inmunoconjugados, inmunotoxinas y coaguligandos usando puente de avidina:biotina o cualquiera de las tecnologías de conjugación química y de reticuladores, desarrolladas con referencia a los conjugados de anticuerpo.

C1. Agentes Tóxicos y Anti-Celulares

Para ciertas aplicaciones, los agentes terapéuticos serán agentes citotóxicos o farmacológicos, particularmente agentes citotóxicos, citostáticos o de otro modo anti-celulares que tienen la capacidad de aniquilar suprimir el crecimiento o división celular de células endoteliales. En general, estos aspectos de la invención contemplan el uso de cualquier agente farmacológico que se pueda conjugar a un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención, y distribuir en forma activa al endotelio seleccionado como objetivo.

Los anticuerpos anti-celulares de ejemplo incluyen agentes quimioterapéuticos, así como citotoxinas. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar incluyen: hormonas, tal como esteroides; anti-metabolitos, tal como citosina-arabinosido, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides de vinca per vinca; demecolcina; etoposido; mitramicina; agentes alquilantes anti-tumor, tal como clorambucilo o melfalano. Otras modalidades pueden incluir agentes tal como citocinas. Básicamente se puede usar cualquier agente anti-celular, en tanto que se pueda conjugar exitosamente a, o asociar con, un anticuerpo de una manera que permitiría su selección como objetivo, inteARNlización,

liberación y/o presentación a los componentes sanguíneos en el sitio de las células endoteliales seleccionadas como objetivo.

Puede haber circunstancias, tal como cuando el antígeno objetivo no se inteARNlice por una ruta consistente con intoxicación eficiente por el compuesto tóxico, donde se deseará dirigir al objetivo los agentes quimioterapéuticos, tal como fármacos anti-tumorales, citocinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, hormonas, y similares. Ahora se han conjugado exitosamente una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros farmacológicos a los anticuerpos y se ha mostrado que funcionan de manera farmacológica, incluyendo doxorubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α-amanitina.

En otras circunstancias, se puede eliminar cualquier efecto secundario potencial de terapia basada en citocinas por el uso de inhibidores de síntesis de ADN, tal como daunorubicina, doxorubicina, adriamicina, y similares. Por lo tanto, estos agentes son ejemplos preferidos de agentes anti-celulares para el uso en la presente invención. En términos de agentes citostáticos, estos compuestos perturban en generar el ciclo celular natural de una célula objetivo, preferentemente de modo que las células se saque del ciclo celular.

Se conoce que una amplia variedad de agentes citotóxicos se pueden conjugar a los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2. Los ejemplos incluyen toxinas útiles derivadas de plantas, hongos o bacterias,

que a manera de ejemplo incluyen varias toxinas de cadena A, particularmente cadena de ricina A; proteínas inactivadoras de ribosoma, tal como saporina o gelonina; α-sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tal como ribonucleasa placentaria; toxina de difteria; y exotoxina de pseudomonas, por nombrar unos pocos.

El libro de toxinas 1992 bien conocido, "Genetically Engineered Toxins", editado por Arthur E. Frankel, incluyendo el apéndice, que incluye las secuencias primarias de aminoácidos de un gran número de toxinas, se incorpora específicamente en la presente como referencia, para los propósitos de describir y permitir adicionalmente el uso de toxinas en construcciones seleccionadas como objetivo.

De las toxinas, se prefieren las cadenas de gelonina y ricina A. La porción de toxina más preferida para el uso con esto es cadena de toxina A que se ha tratado para modificar o remover residuos de carbohidrato, la llamada cadena A desglicosilada (dgA). Se prefiere la cadena de ricina A desglicosilada debido a su extrema potencia, larga vida media, y debido a que es económicamente factible de elaborar a un grado y escala clínica.

Puede ser deseable desde un punto de vista farmacológico emplear la molécula más pequeña posible que proporcione sin embargo una respuesta biológica apropiada. De esta manera, se puede desear emplear péptidos más pequeños de cadena A que proporcionarán una respuesta anti-celular adecuada. Para este fin, se ha descubierto que la

cadena de ricina A se puede "truncar" por la remoción de 30 aminoácidos N-terminales por Nagarase (Sigma), y aún retener una actividad adecuada de toxina. Se propone que donde se desee, esta cadena A truncada se puede emplear en conjugados de acuerdo con la invención.

De manera alteARNtiva, se puede encontrar que la aplicación de tecnología de ADN recombinante a la porción de cadena de toxina A proporcionará beneficios adicionales de acuerdo con la invención. Ya que se ha logrado la clonación y expresión de la cadena de ricina A biológicamente activa, ahora es posible identificar y preparar péptidos más pequeños, o de otro modo, variantes, que sin embargo exhiben una actividad apropiada de toxina. Además, el hecho que ahora se haya clonado la cadena de ricina A permite la aplicación de mutagénesis dirigida al sitio, a través de lo cual se puede preparar fácilmente y seleccionar péptidos derivados de cadena A y obtener porciones adicionales útiles para el uso en unión con la presente invención.

C2. Factores de Coagulación

El anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención se puede enlazar a un componente que es capaz de estimular de manera directa o indirecta la coagulación, para formar un coaguligando. Aquí, los anticuerpos se pueden enlazar directamente al coagulante o factor de coagulación, o se pueden enlazar a una segunda región de unión que se une y entonces libera el coagulante o factor de coagulación. Como se usa en la presente, los términos "coagulante" y "factor de coagulación" se usan

cada uno para referirse a un componente que es capaz de estimular de manera directa o indirecta la coagulación bajo condiciones apropiadas, preferentemente cuando se proporciona a un ambiente específico *in vivo*, tal como la vasculatura tumoral.

Los factores preferidos de coagulación son composiciones del factor de tejido, tal como TF truncado (tTF), moléculas diméricas, multiméricas y mutantes de TF. "TF truncado" (tTF) se refiere a construcciones de TF que se vuelven deficientes de unión a membrana por remoción de suficientes secuencias de aminoácidos para efectuar este cambio en la propiedad. Una "cantidad suficiente" en este contexto es una cantidad de secuencia de aminoácidos transmembrana originalmente suficiente para introducir la molécula de TF en la membrana, o para mediar de otro modo la unión a membrana funcional de la proteína de TF. La remoción de esta "cantidad suficiente" de secuencia que abarca transmembrana" crea por lo tanto una proteína truncada de factor de tejido, o polipéptido, deficiente en la capacidad de unión a membrana de fosfolípido, tal que la proteína sea sustancialmente una proteína soluble que no se une de manera significativa a membranas de fosfolípido. La TF truncada falla de esta manera sustancialmente en convertir el Factor VII a Factor VIIa en un ensayo normal de TF, y aún retiene la llamada actividad catalítica que incluye activar el Factor X en la presencia del Factor VIIa.

La patente de los Estados Unidos número 5,504,067 se incorpora específicamente en la presente por referencia

para los propósitos de describir adicionalmente estas proteínas truncadas del factor de tejido. De manera preferente, los factores de tejido para el uso en estos aspectos de la presente invención carecerán en general de las regiones transmembrana y citosólicas (aminoácidos 220-263) de la proteína. Sin embargo, no hay necesidad de que las moléculas truncadas de TF se limiten a moléculas de la longitud exacta de 219 aminoácidos.

También pueden ser útiles como dímeros las composiciones de factor de tejido. Se puede preparar cualquiera de las construcciones truncadas, mutadas u otras de factor de tejido en una forma dimérica para el uso en la presente invención. Como es bien sabido por el experto en la técnica, estos dímeros de TF se pueden preparar al emplear las técnicas normales de biología molecular y expresión recombinante, en las cuales se preparan dos regiones codificantes en cuadro y se expresan de un vector de expresión. Igualmente, se pueden emplear varias tecnologías de conjugación química en unión con la preparación de dímeros de TF. Los monómeros individuales de TF se pueden derivatizar antes de la conjugación. Todas estas técnicas serán fácilmente conocidas por los expertos en la técnica.

Si se desea, los dímeros o multímeros de factor de tejido se pueden unir mediante un enlace biológicamente liberable, tal como una secuencia de aminoácidos o ligador selectivamente escindible. Por ejemplo, se contemplan ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para una enzima preferencialmente localizada o activa dentro de

un ambiente tumoral. Las formas de ejemplo de estos ligadores peptídicos son aquellas que se escinden por urocinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa, o una metaloproteinasa, tal como colagenasa, gelatinasa o estromelisina.

En ciertas modalidades, los dímeros de factor de tejido pueden comprender además una porción de inserción de membrana, hidrófoba, impedida, para alentar posteriormente la asociación funcional del factor de tejido con la membrana de fosfolípido, pero sólo bajo ciertas condiciones definidas. Como se describe en el contexto de los factores de tejido truncados, en general las secuencias de asociación a membrana, hidrófobas, son tramos de aminoácidos que promueven la asociación con el ambiente de fosfolípidos debido a su naturaleza hidrófoba. Igualmente, se pueden usar ácidos grasos para proporcionar la porción potencial de inserción a membrana.

Estas secuencias de inserción a membrana pueden estar localizadas ya sea en el N-término o el C-término de la molécula de TF, o en general anexadas en cualquier otro punto de la molécula en tanto que su unión a la misma no impida las propiedades funcionales de la construcción de TF. La intención de la porción de inserción, impedida, es que permanezca no funcional hasta que la construcción de TF se localice dentro del ambiente tumoral, y permita que el anexo hidrófobo llegue a ser accesible y promueva aún además la asociación física con la membrana. Nuevamente, se contempla que los enlaces biológicamente liberables y las secuencias selectivamente escindibles serán

particularmente útiles a este respecto, con el enlace o secuencia que se escinde solo o se modifica de otro modo en la localización dentro del ambiente tumoral y exposición a enzimas particulares u otras moléculas bioactivas.

En otras modalidades, las construcciones de tTF pueden ser multiméricas o poliméricas. En este contexto, una "construcción polimérica" contiene 3 o más construcciones de factor de tejido. Una "construcción de TF multimérica o polimérica" es una construcción que comprende una primera molécula de TF, o un derivado, operativamente unida a al menos una segunda y una tercera molécula de TF, o derivado. Los multímeros pueden comprender entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 de estas moléculas de TF. Las unidades individuales de TF dentro de los multímeros o polímeros también se pueden enlazar por ligadores peptídicos selectivamente escindibles u otros enlaces biológicamente liberables, como se desee. Nuevamente, como con los dímeros de TF analizados anteriormente, las construcciones se pueden hacer fácilmente usando ya sea manipulación recombinante y expresión o usando química de síntesis normal.

Las construcciones de TF aún adicionales útiles en el contexto de la presente invención son aquellos mutantes deficientes en la capacidad para activar el Factor VII. Estos "mutantes de activación de Factor VII" se definen en general en la presente como mutantes de TF que se unen al Factor VII/VIIa funcional, activan proteolíticamente el Factor X, pero están sustancialmente libres de la capacidad de activar proteolíticamente el

Factor VII. Por consiguiente, estas construcciones son mutantes de TF que carecen de la actividad de activación del Factor VII.

La capacidad de estos mutantes de activación de Factor VII para funcionar en la promoción de la coagulación específica de tumor, se basa en su distribución específica a la vasculatura tumoral, y en la presencia del Factor VIIa a bajos niveles en plasma. En la administración de este conjugado de mutante de activación de Factor VII, el mutante se localizará dentro de la vasculatura de un tumor vascularizado. Antes de la localización, el mutante de TF será en general incapaz de promover la coagulación en cualquier otro sitio del cuerpo, con base en su incapacidad para convertir el Factor VII o el Factor VIIa. Sin embargo, en la localización y acumulación dentro de la región tumoral, el mutante entonces encontrará suficiente Factor VIIa del plasma a fin de iniciar la ruta extrínseca de coagulación, que conduce a trombosis específica de tumor. También al paciente se puede administrar Factor VIIa exógeno.

Se puede preparar cualquiera o más de una variedad de mutantes de activación de Factor VII y usar en unión con la presente invención. Existe una cantidad significativa de conocimiento científico con respecto a los sitios de reconocimiento en la molécula de TF para el Factor VII-VIIa. De esta manera, se entenderá que la región de activación del Factor VII está en general entre aproximadamente el aminoácido 157 y aproximadamente el aminoácido 167 de la molécula de TF. Sin embargo, se

contempla que los residuos fuera de esta región también pueden probar ser pertinentes a la actividad de activación del Factor VII, y por lo tanto se puede considerar introducir mutaciones en cualquiera o más de los residuos en general localizados entre aproximadamente el aminoácido 106 y aproximadamente el aminoácido 209 de la secuencia de TF (WO 94/07515; WO 94/28017; cada una incorporada en la presente como referencia).

Se puede usar una variedad de otros factores de coagulación en unión con la presente invención, como se ejemplifica por los agentes expuestos más adelante. En la presente invención se pueden usar trombina, Factor V/Va y derivados, Factor VIII/VIIIa y derivados, Factor IX/IXa y derivados, Factor X/Xa y derivados, Factor XI/XIa y derivados, Factor XII/XIIa y derivados, Factor XIII/XIIIa y derivados, activador de Factor X y activador de Factor V.

Para el uso en esta invención se contempla el activador de Factor X de veneno de víbora de Russell. También se han producido anticuerpos monoclonales específicos para el activador de Factor X presente en el veneno de víbora de Russell, y se pueden usar para distribuir de manera específica el agente como parte de un ligando de unión biespecífica.

El tromboxano $A_2$ se forma de endoperóxidos por las acciones secuenciales de las enzimas ciclooxigenasa y tromboxano-sintetasa en microsomas de plaquetas. Se genera fácilmente tromboxano $A_2$ por plaquetas y es un potente vasoconstrictor, en virtud de su capacidad para producir agregación de plaquetas. Tanto el tromboxano $A_2$ como los

análogos activos del mismo se contemplan para el uso en la presente invención.

También se pueden usar tromboxano-sintasa, y otras enzimas que sintetizan prostaglandinas activadoras de plaquetas, como "coagulantes" en el presente contexto. Los anticuerpos monoclonales a, y la purificación por inmunoafinidad de, tromboxano-sintasa se conocen; como es el cADN para tromboxano-sintasa humana.

La α2-antiplasmina, o inhibidor de α2-plasmina, es un inhibidor de proteinasa presente de manera natural en el plasma humano que funciona para inhibir de manera efectiva la lisis de coágulos de fibrina inducida por activador de plasminógeno. La α2-antiplasmina es un inhibidor particularmente potente, y se contempla para el uso en la presente invención.

Puesto que está disponible la secuencia de cADN para α2-antiplasmina, se prefieren proteínas de fusión y/o expresión recombinante. También están disponibles anticuerpos monoclonales contra α2-antiplasmina que se pueden usar en las modalidades de ligando de unión biespecífica de la invención. Estos anticuerpos entonces se pueden usar para distribuir α2-antiplasmina exógena al sitio objetivo o para almacenar α2-antiplasmina endógena y concentrarla dentro de la región seleccionada como objetivo.

C3. Fármacos anti-Tubulina

Una variedad de fármacos ejerce sus efectos mediante la interferencia con la actividad de tubulina. Puesto que las funciones de la tubulina son esenciales a la

mitosis y viabilidad celular, ciertos "fármacos anti-tubulina" son poderosos agentes quimioterapéuticos. Los "fármacos anti-tubulina", como se usa en la presente, significa cualquier agente, fármaco, profármaco o combinación de los mismos que inhiba la mitosis celular, preferentemente al inhibir de manera directa o indirecta las actividades de tubulina necesarias para mitosis celular, preferentemente polimerización o despolimerización de tubulina.

Algunos de los fármacos anti-tubulina más bien conocidos y actualmente preferidos para el uso con la presente invención son colquicina; taxanos, tal como taxol (paclitaxel) y docetaxel; alcaloides de vincapervinca, tal como vinblastina, vincristina y vindescina; y combretastatinas. Otros fármacos anti-tubulina adecuados son citocalasinas (incluyendo B, J, E), dolastatina, auristatina PE, paclitaxel, ustiloxina D, rizoxina, 1069C85, colcemid, albendazol, azatoxina y nocodazol.

Como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,892,069, 5,504,074 y 5,661,143, las combretastatinas son derivados de estradiol que inhiben en general la mitosis celular. Las combretastatinas de ejemplo que se pueden usar en unión con la invención incluyen aquellas basadas en combretastatina A, B y/o D y aquellas descritas en las patentes de los Estados Unidos número 5,892,069, 5,504,074 y 5,661,143. Las combretastatinas A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3 y B-4 son de ejemplo de los tipos anteriores.

Las patentes de los Estados Unidos números

5,569,786 y 5,409,953 describen el aislamiento, caracterización estructural y síntesis de cada una de las combretastatinas A-1, A-2, A-3, B-1, B-2, B-3 y B-4 y formulaciones y métodos para usar estas combretastatinas para tratar crecimiento neoplástico. Se puede usar cualquiera o cualesquiera de estas combretastatinas en unión con la presente invención.

También se puede usar con la presente la combretastatina A-4, como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,892,069, 5,504,074, 5,661,143 y 4,996,237. La patente de los Estados Unidos número 5,561,122 describe además profármacos adecuadas de combretastatina A-4, que se contemplan para el uso combinado con la presente invención.

La patente de los Estados Unidos número 4,940,726 describe de manera particular lactomas macrocíclicas denominadas combretastatina D-1 y "Combretastatina D-2", cada una de las cuales se puede usar en combinación con las composiciones y métodos de la presente invención. La patente de los Estados Unidos número 5,430,062 se refiere a derivados de estilbeno y análogos de combretastatina con actividad anti-cáncer que se pueden usar en combinación con la presente invención.

C4. Agentes anti-Angiogénicos

La presente invención proporciona de manera particular anti-angiogénicos combinados. Los anticuerpos humanos de la invención se pueden unir a una angiopoyetina (Davis y Yancopoulos, 1999; Holash et al., 1999; incorporada en la presente como referencia), tal como

angiopoyetina-1 (Ang-1), angiopoyetina-2 (Ang-2), angiopoyetina-3 (ratón) o angiopoyetina-4 (humano) (Valenzuela et al., 1999; Kim et al., 1999).

Los anti-angiogénicos de ejemplo para el uso con la presente incluyen angiostatina y endostatina. La angiostatina se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,776,704; 5,639,725 y 5,733,876, cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia. La angiostatina es una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kD y aproximadamente 45 kD, como se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida reductor, que contiene aproximadamente las regiones 1 hasta 4 Kringle de una molécula de plasminógeno. En general la angiostatina tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a aquella de un fragmento de plasminógeno murino empezando en el aminoácido número 98 de una molécula intacta de plasminógeno murino.

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre las especies. Por ejemplo, en angiostatina humana, la secuencia de aminoácidos es sustancialmente similar a la secuencia del fragmento de plasminógeno murino descrito anteriormente, aunque una secuencia de angiostatina humana activa puede iniciar ya sea en el aminoácido número 97 ó 99 de una secuencia intacta de aminoácidos de plasminógeno humano. Además, se puede usar plasminógeno humano, puesto que tiene actividad anti-angiogénica similar, como se muestra en un modelo de tumor de ratón.

La angiostatina y la endostatina han llegado a

ser el foco de estudio intensivo, puesto que son los primeros inhibidores de la angiogénesis que han demostrado la capacidad no sólo de inhibir el crecimiento tumoral sino también de provocar regresión tumoral en ratones. Hay múltiples proteasas que se han mostrado que producen angiostatina a partir de plasminógeno, incluyendo elastasa, macrófago-metaloelastasa (MME), matrilisina (MMP-7), y gelatinasa B/colagenasa tipo IV de 92 kDa (MMP-9).

Se puede producir angiostatina MME a partir de plasminógeno en tumor y el factor estimulador de colonia de granulocitos-macrófagos (GMCSF) favorece la expresión de MME por macrófagos que inducen la producción de angiostatina. El papel de MME en la generación de angiostatina se soporta por el hallazgo que MME en realidad se expresa en muestras clínicas de carcinomas hepatocelulares de pacientes. Otra proteasa que se piensa que es capaz de producir angiostatina es estromelisina-1 (MMP-3). Se ha mostrado que la MMP-3 produce fragmentos tipo angiostatina a partir de plasminógeno *in vitro*. Actualmente no es claro el mecanismo de acción para la angiostatina, se tiene como hipótesis que se une a un receptor no identificado de la superficie celular en células endoteliales que induce a la célula endotelial a sufrir muerte celular programada o detención mitótica.

La endostatina parece ser un agente anti-angiogénesis y anti-tumoral más poderoso y se prefiere de manera particular para el enlace a los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2. La endostatina es efectiva en provocar regresiones en el número de modelos de

tumor en ratones. Los tumores que desarrollan resistencia a endostatina, y después de múltiples ciclos de tratamiento, los tumores entran a un estado inactivo durante el cual no se incrementan en volumen. En este estado inactivo, se incrementó el porcentaje de células tumorales que sufren apoptosis, produciendo una población que está esencialmente al mismo tamaño.

La patente de los Estados Unidos número 5,854,205, de Folkman y O'Reilly, incorporada específicamente en la presente como referencia, se refiere a endostatina y su uso como un inhibidor de la proliferación de células endoteliales y angiogénesis. La proteína endostatina corresponde a un fragmento C-terminal de colágeno tipo XVIII, y la proteína se puede aislar de una variedad de fuentes. La patente de los Estados Unidos número 5,854,205 también enseña que la endostatina puede tener una secuencia de aminoácidos de un fragmento de colágeno tipo XVIII, un colágeno tipo XV o esterasa pregástrica BOVMPE 1. Las combinaciones de endostatina con otras proteínas anti-angiogénicas, particularmente angiostatina, también se describen por la patente de los Estados Unidos número 5,854,205, tal que las composiciones combinadas son capaces de reprimir de manera efectiva la masa de un tumor dependiente de angiogénesis.

La endostatina y la angiostatina, particularmente la endostatina, son agentes preferidos para la distribución tumoral de acuerdo a la presente invención. También, la vasculostatina, canstatina y maspina son agentes preferidos. Se pueden preparar proteínas de fusión de

endostatina, como se describe en la patente de los Estados Unidos número 6,342,221, incorporada en la presente como referencia. También se pueden preparar varias formas de construcciones de endostatina químicamente enlazadas, nuevamente como se ejemplifica en la patente de los Estados Unidos número 6,342,221.

C5. Agentes Inductores de Apoptosis

La presente invención también se puede usar para distribuir agentes que inducen apoptosis en cualquier célula dentro del tumor, incluyendo células tumorales y células endoteliales, vasculares, tumorales. Aunque muchos agentes anti-cáncer pueden tener, como parte de su mecanismo de acción, un efecto inductor de apoptosis, se ha descubierto, diseñado o seleccionado ciertos agentes con este mecanismo primario, como se describe más adelante.

Muchas formas de cáncer tienen reportes de mutaciones en los genes supresores de tumor, tal como p53. La inactivación de p53 da por resultado una falla para promover la apoptosis. Con esta falla, las células de cáncer progresan en tumorigénesis, en lugar de llegar a ser destinadas para la muerte celular. De esta manera, también se contempla la distribución de supresores tumorales para el uso en la presente invención para estimular la muerte celular. Los supresores tumorales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, p53, gen de retinoblastoma (Rb), tumor de Wilm (WTI), bax alfa, enzima convertidora de interleucina-1b y familia, gen MEN-1, neurofibromatosis, tipo 1 (NF1), inhibidor p16 de cdk, gen de cáncer colorrectal (DCC), gen de poliposis de adenomatosis

familiar (FAP), gen supresor de múltiples tumores (MTS-1), BRCA1 y BRCA2.

Preferidos para el uso son los genes p53 (patentes de los Estados Unidos números 5,747,469; 5,677,178; y 5,756,455; cada una incorporada en la presente como referencia), retinoblastoma, BRCA1 (patentes de los Estados Unidos números 5,750,400; 5,654,155; 5,710,001; 5,756,294; 5,709,999; 5,693,473; 5,753,441; 5,622,829; y 5,747,282; cada una incorporada en la presente como referencia), MEN-1 (número de acceso a GenBank U93236) y adenovirus E1A (patente de los Estados Unidos número 5,776,743; incorporada en la presente como referencia).

Otras composiciones que se pueden distribuir mediante los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 incluyen genes que codifican para el ligando inductor de apoptosis relacionado a factor de necrosis tumoral, llamado TRAIL, y el polipéptido de TRAIL (patente de los Estados Unidos número 5,763,223; incorporada en la presente como referencia); la proteasa asociada a apoptosis de 24 kD de la patente de los Estados Unidos número 5,605,826 (incorporada en la presente como referencia); factor 1 asociado a Fas, FAF1 (patente de los Estados Unidos número 5,750,653; incorporada en la presente como referencia). También se contempla para el uso en estos aspectos de la presente invención la provisión de la enzima convertidora de interleucina-1β y miembros de la familia, que también se reportan que estimulan apoptosis.

También se pueden usar compuestos tal como derivados de carboestirilo (patentes de los Estados Unidos

números 5,672,603; y 5,464,833; cada una incorporada en la presente como referencia); péptidos apogénicos ramificados (patente de los Estados Unidos número 5,591,717; incorporada en la presente como referencia); inhibidores de fosfotirosina y análogos de fosfotirosina no hidrolizables (patentes de los Estados Unidos números 5,565,491; y 5,693,627; cada una incorporada en la presente como referencia); agonistas de receptores retinoides RXR (patente de los Estados Unidos número 5,399,586; incorporada en la presente como referencia); y aún antioxidantes (patente de los Estados Unidos número 5,571,523; incorporada en la presente como referencia). También se pueden enlazar inhibidores de tirosina-cinasa, tal como genisteína, a los agentes de la presente invención que seleccionan como objetivo el receptor de superficie celular, VEGFR1 (como se soporta por la patente de los Estados Unidos número 5,587,459; incorporada en la presente como referencia).

El "segundo activador derivado de mitocondrias de caspasa" (SMAC), también conocido como DIABLO, es una proteína que se libera de las mitocondrias durante la apoptosis y se une a una familia de proteínas llamadas "inhibidor de proteínas de apoptosis" (IAP). Los niveles de expresión de IAP se incrementan en varios tumores humanos. Por lo tanto, como agentes anti-cáncer se han desarrollado antagonistas de IAP o miméticos de SMAC. Estos se pueden usar en unión con la presente invención, tanto como conjugados y en terapias de combinación.

Los inhibidores de IAP de ejemplo incluyen

aquellos desarrollados con base en la estructura cristalina de la interacción de SMAC con el dominio BIR3 de IAP X-enlazada (XIAP, también conocida como BIRC4) y los antagonistas monovalentes y bivalentes de IAP diseñados usando un planteamiento basado en estructura (Vince et al., 2007; Varfolomeev et al., 2007). También se pueden usar miméticos de SMAC diseñados para semejarse a los aminoácidos N-terminales de SMAC, que interactúan con el dominio BIR3 de XIAP (Petersen et al., 2007). Se ha mostrado que los miméticos de SMAC pueden inducir regresión de xenoinjertos sensibles de cáncer de pulmón humano como agentes individuales, con 40 % de los animales tratados que permanecen libres de tumores (Petersen et al., 2007).

C6. Citocinas

Las citocinas y quimiocinas son ejemplos particulares de agentes para el enlace al anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 de la presente invención. Se puede usar una variedad de citocinas, que incluyen IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-13, TGF-β, M-CSF, G-CSF, TNFβ, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, IFN-α, IFN-β. Las citocinas más preferidas incluyen IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN-γ, proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor BB de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) y proteína C-reactiva (CRP) y similares. Los ejemplos particularmente preferidos son TNFα, inductores de TNFα, IL-2, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ y LEC.

Por ejemplo, se puede unir IL-12 a un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 y usar para redirigir

las defensas del hospedador para atacar los vasos tumorales. La quimiocina LEC (quimiocina expresada en hígado, también conocida como NCC-4, HCC-4, o LMC) es otro componente preferido (Giovarelli et al., 2000). La LEC es quimiotáctica para células dendríticas, monocitos, células T, células NK y neutrófilos y por lo tanto puede mejorar las respuestas anti-tumorales mediadas por el hospedador.

C7. Equivalentes Biológicamente Funcionales

Ahora se pueden elaborar equivalentes, o aún mejoras, de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención. Se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de este anticuerpo y obtener aún una molécula que tenga características similares o igualmente deseables. Por ejemplo, se pueden sustituir ciertos aminoácidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de la capacidad interactiva de unión. Estas consideraciones también aplican a toxinas, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, coagulantes y similares.

Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de la proteína, se pueden hacer ciertas sustituciones de la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína (o por supuesto, la secuencia subyacente de ADN) y obtener sin embargo una proteína con propiedades similares (agonista). De esta manera, se contempla que se pueden hacer varios cambios en la secuencia de los anticuerpos o agentes terapéuticos (o secuencias subyacentes de ADN) sin pérdida apreciable de su

utilidad o actividad biológica. Se pueden producir equivalentes biológicos funcionales hechos de la mutación de una secuencia subyacente de ADN, usando la información de codones proporcionada en la presente en la Tabla A, y los detalles técnicos de soporte de la mutagénesis específica de sitio.

También es bien entendido por el experto en la técnica que, inherente en la definición de una proteína o péptido "biológicamente funcional, equivalente", está el concepto que hay un límite al número de cambios que se pueden hacer dentro de una porción definida de la molécula y aún dar por resultado una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Las proteínas y péptidos biológicamente equivalentes, funcionales de esta manera se definen en la presente como aquellas proteínas y péptidos en los cuales se pueden sustituir ciertos, no la mayoría ni todos, los aminoácidos. Por supuesto, se puede hacer fácilmente una pluralidad de distintas proteínas/péptidos con diferentes sustituciones, y usar de acuerdo con la invención. Estos péptidos "biológicamente equivalentes, funcionales" se pueden considerar como ejemplos adicionales de secuencias "sustancialmente homólogas" como se describe en la presente.

Las sustituciones de los aminoácidos se basan en general en la similitud relativa de los sustituyentes de aminoácido de cadena lateral, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos revela que la arginina,

lisina e histidina son todos residuos positivamente cargados; que la alanina, glicina y serina son de un tamaño similar; y que la fenilalanina, triptófano y tirosina tienen todos una forma en general similar. Por lo tanto, con base en estas consideraciones, la arginina, lisina e histidina; la alanina, glicina y serina; y la fenilalanina, triptófano y tirosina; se definen en la presente como equivalentes biológicamente funcionales.

Al hacer más cambios cuantitativos, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se ha asignado un índice hidropático con base en su hidrofobicidad y características de carga, estos son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2; glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva en una proteína en general se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982; incorporada en la presente como referencia). Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar o puntuación hidropática similar y retener aún una actividad biológica similar. Al hacer cambios con base enl índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén

dentro de ± 2, aquellos que estén dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de ± 0.5 son aún más particularmente preferidos.

De esta manera, se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tiene un valor similar de hidrofilicidad y obtener aún una proteína biológicamente equivalente. Como se detalla en la patente de los Estados Unidos número 4,554,101 (incorporada en la presente como referencia), se han asignado los siguientes valores de hidrofilicidad a los residuos de aminoácido: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1; glutamato (+3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 ± 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5); triptófano (-3.4).

Al hacer cambios con base en los valores de hidrofilicidad, la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad estén dentro de ±2 se prefiere, son particularmente preferidos aquellos que están dentro de ±1 y son aún más particularmente preferidos aquellos dentro de ±0.5.

C8. Proteínas de Fusión y Expresión Recombinante

El anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugados de la presente invención se pueden preparar fácilmente como proteínas de fusión usando técnicas de biología molecular. Cualquier proteína de fusión se puede diseñar y hacer usando cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente y aquellos

conocidos en la técnica. La tecnología de proteínas de fusión se adapta fácilmente para preparar proteínas de fusión en las cuales se unan las dos porciones por una secuencia peptídica selectivamente escindible. Se puede unir cualquier agente terapéutico al término del anticuerpo o a cualquier punto distinto de las CDR. Los agentes terapéuticos también se pueden preparar "de manera integral", en donde se asocian preferentemente con un péptido selectivamente escindible para permitir la liberación del agente después de la selección del objetivo.

El uso de técnicas de ADN recombinante para lograr estos extremos ahora es práctica normal para los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo*/recombinación genética. La síntesis de ADN y de ARN se puede realizar, adicionalmente, usando sintetizadores automatizados (ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1989; incorporada en la presente como referencia).

La preparación de esta proteína de fusión conlleva en general la preparación de una primera y una segunda región codificante de ADN y la ligación funcional o la unión de estas regiones, en cuadro, para preparar una región codificante individual que codifica para la proteína deseada de fusión. En el presente contexto, la secuencia de ADN del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 se unirá en cuadro con una secuencia de ADN que codifica para un agente terapéutico. En general no se cree que sea particularmente pertinente qué porción de la construcción

se prepara como la región N-terminal o como la región C-terminal.

Una vez que se ha producido la región codificante deseada, se crea un vector de expresión. Los vectores de expresión contienen uno o más promotores en la dirección 5' de las regiones insertadas de ADN que actúan para promover la transcripción del ADN y de esta manera para promover la expresión de la proteína recombinante codificada. Éste es el significado de "expresión recombinante".

Para obtener una llamada versión "recombinante" del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención o inmunoconjugado del mismo, se expresa en una célula recombinante. La creación por ingeniería de segmentos de ADN para la expresión en un sistema procariótico o eucariótico se puede realizar por técnicas en general conocidas por los expertos en expresión recombinante. Se cree que se puede emplear virtualmente cualquier sistema de expresión en la expresión de un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o construcciones de inmunoconjugado.

Estas proteínas se pueden expresar de manera exitosa en sistemas eucarióticos de expresión, por ejemplo, células CHO, sin embargo, se contempla que serán particularmente útiles los sistemas bacterianos de expresión, tal como *E. coli* pQE-60 para la preparación a gran escala y la purificación subsiguiente del anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugados. Los cADN también se pueden expresar en sistemas bacterianos, con las proteínas codificadas que se expresan

como fusiones con α-galactosidasa, ubiquitina, glutationa-S-transferasa de *Schistosoma japonicum,* y similares. Se cree que la expresión bacteriana tendrá ventajas con respecto a la expresión eucariótica en términos de facilidad de uso y en términos de la cantidad de materiales obtenidos de este modo.

En términos de expresión microbiana, las patentes de los Estados Unidos números 5,583,013; 5,221,619; 4,785,420; 4,704,362; y 4,366,246 se incorporan en la presente como referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente la presente descripción en unión con la expresión de genes en células hospedadoras recombinantes.

Los inmunoconjugados o anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, producidos de manera recombinante se pueden purificar y formular para administración humana. De manera alteARNtiva, mediante terapia génica se pueden distribuir ácidos nucleicos que codifican para los inmunoconjugados. Aunque se puede emplear ADN recombinante desnudo o plásmidos, se prefiere el uso de liposomas o vectores. La capacidad de ciertos virus para entrar en las células mediante la endocitosis mediada por receptor y para integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes virales de manera estable y eficiente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños en células mamíferas. Los vectores preferidos de terapia génica para el uso de la presente invención serán en general vectores virales.

Los retrovirus tienen promisión como vectores de

distribución génica debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma hospedador, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y que se empaquen en líneas celulares especiales. También se pueden crear por ingeniería otros virus, tal como adenovirus, virus de herpes simplex (HSV), citomegalovirus (CMV) y virus adeno-asociado (AAV), tal como aquellos descritos por la patente de los Estados Unidos número 5,139,941 (incorporada en la presente como referencia), para servir como vectores para transferencia génica.

Aunque algunos virus que pueden aceptar material genético extraño están limitados en el número de nucleótidos que pueden ajustar y en la variedad de células que pueden infectar, estos virus han demostrado que efectúan de manera exitosa la expresión génica. Sin embargo, los adenovirus no integran su material genético en el genoma hospedador y por lo tanto no requieren replicación del hospedador para la expresión génica, haciéndolos idealmente adecuados para expresión génica rápida, eficiente y heteróloga. Son bien conocidas las técnicas para preparar virus infecciosos, defectuosos en la replicación.

En ciertas modalidades adicionales, el vector de terapia génica será HSV. Un factor que hace al HSV un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Debido a que el HSV es grande, es problemática la incorporación de múltiples genes o casetes de expresión con respecto a otros sistemas virales más pequeños. Además, la

disponibilidad de diferentes secuencias de control viral con desempeño variable (por ejemplo, temporal, resistencia) hace posible controlar la expresión a un mayor grado que en otros sistemas. También es una ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes empalmados, facilitando adicionalmente manipulaciones genéticas. El HSV también es relativamente fácil de manipular y se puede cultivar hasta altos títulos.

Por supuesto, usando sistemas de distribución viral, se deseará purificar el virión de manera suficiente para volverlo esencialmente libre de contaminantes indeseables, tal como partículas virales intermedias defectuosas o endotoxinas y otros pirógenos tal que no provocarán ninguna reacción indeseada en la célula, animal o individuo que recibe la construcción de vector. Un medio preferido para purificar el vector comprende el uso de gradientes de densidad flotante, tal como centrifugación por gradiente de cloruro de cesio.

C9. Conjugados de Anticuerpo

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 se pueden conjugar a agentes anti-celulares o citotóxicos, para preparar "inmunotoxinas"; o asociado de manera operativa con componentes que son capaces de estimular directa o indirectamente la coagulación, formando de este modo un "coaguligando". En los coaguligandos, el anticuerpo se puede enlazar directamente a un factor de coagulación directa o indirecta, o se puede enlazar a una segunda región de unión que se une y luego libera un factor de coagulación directa o indirecta. El planteamiento de

"segunda región de unión" usa en general un anticuerpo de unión a coagulante como una segunda región de unión, que da por resultado de esta manera una construcción de anticuerpo biespecífico. La preparación y uso de anticuerpos biespecíficos en general es bien conocida en la técnica, y se describe adicionalmente en la presente.

En la preparación de inmunotoxinas, coaguligandos y anticuerpos biespecíficos, se puede emplear expresión recombinante. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo elegido se unen, en cuadro, a las secuencias de ácido nucleico que codifican para la toxina, coagulante o segunda región de unión, elegidas, para crear una unidad o vector de expresión. La expresión recombinante da por resultado la traducción del nuevo ácido nucleico, para producir el producto deseado de proteína. Aunque se emplean ácidos nucleicos que codifican para anticuerpo, en lugar de los ligandos de unión a proteína, el planteamiento recombinante es esencialmente el mismo como aquellos descritos anteriormente en la presente.

Regresando a la tecnología de conjugados, en general es bien conocida en la técnica la preparación de inmunotoxinas. Sin embargo, se pueden lograr ciertas ventajas a través de la aplicación de cierta tecnología preferida, tanto en la preparación de inmunotoxinas como en su purificación para administración clínica subsiguiente. Por ejemplo, en tanto que las inmunotoxinas basadas en IgG exhibirán típicamente mejor capacidad de unión y menor depuración sanguínea que sus contrapartes de Fab', en general, las inmunotoxinas basadas en fragmento Fab'

exhibirán mejor capacidad de penetración en tejido en comparación a las inmunotoxinas basadas en IgG.

Adicionalmente, en tanto que se conoce que numerosos tipos de ligadores que contienen enlaces de disulfuro se pueden emplear de manera exitosa para conjuga la porción de toxina al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, en general se prefieren ciertos ligadores con respecto a otros ligadores, con base en diferentes características y capacidades farmacológicas. Por ejemplo, los ligadores que contienen un enlace de disulfuro que está estéricamente "impedido" se van a preferir, debido a su mayor estabilidad, *in vivo*, impidiendo de este modo la liberación de la porción de toxina antes de la unión en el sitio de acción.

Se conoce que una amplia variedad de agentes citotóxicos se pueden conjugar al anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, incluyendo toxinas derivadas de plantas, hongos y bacterias, tal como cadena de ricina A o cadena A desglicosilada. La reticulación de una cadena de toxina A a un anticuerpo, en ciertos casos, requiere un reticulador que presente funciones de disulfuro. La razón para esto no es clara, pero es probablemente debido a la necesidad de ciertas porciones de toxina a ser liberables fácilmente del anticuerpo una vez que el agente haya "distribuido" la toxina a las células seleccionadas como objetivo.

Cada tipo de reticulador, así como se desempeña la reticulación, tenderá a variar la farmacodinámica del conjugado resultante. Finalmente, en casos donde se

Organización y
Digitalización CSA Ltda

2/2

# PATENTE DE INVENCIÓN

10-67350

contempla una toxina liberable, se desea tener un conjugado que permanecerá intacto bajo las condiciones encontradas en todo el cuerpo excepto en el sitio propuesto de acción, punto en el cual se desea que el conjugado tenga buenas características de "liberación". Por lo tanto, el esquema particular de reticulación, incluyendo en particular el agente reticulador particular usado y las estructuras que se reticulan, serán de algún significado.

Dependiendo del compuesto específico de toxina usado como parte de la proteína de fusión, puede ser necesario proporcionar un separador peptídico que une de manera operativa el anticuerpo y el compuesto de toxina que es capaz de plegarse en una estructura de asa enlazada por disulfuro. La escisión proteolítica dentro de la asa entonces producirá un polipéptido heterodimérico en donde el anticuerpo y el compuesto de toxina se enlazan por sólo un enlace individual de disulfuro. Un ejemplo de esta toxina es una toxina de cadena de Ricina A.

Cuando se utilicen ciertos compuestos diferentes de toxina, se puede proporcionar un separador peptídico no escindible para unir de manera operativa el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 y el compuesto de toxina de la proteína de fusión. Las toxinas que se pueden usar en unión con los separadores peptídicos no escindibles son aquellas que se pueden convertir, por sí mismas, por escisión proteolítica, en una forma citotóxica enlazada por disulfuro. Un ejemplo de este compuesto de toxina es un compuesto de exotoxina de *Pseudomonas*.

Puede haber circunstancias, tal como cuando el

antígeno objetivo no se inteARNliza por una ruta consistente con la intoxicación eficiente por inmunotoxinas, donde se deseará dirigir al objetivo agentes quimioterapéuticos tal como agentes anti-tumorales, otras citocinas, antimetabolitos, agentes de alquilación, hormonas, y similares. Ahora se ha conjugado exitosamente una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros farmacológicos a los anticuerpos y han mostrado que funcionan de manera farmacológica. Los agentes antineoplásticos de ejemplo que se han investigado incluyen doxorrubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, y varios otros. Además, se ha descrito la unión de otros agentes tal como neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α-amanitina.

Donde se usan factores de coagulación en unión con la presente invención, cualquier enlace covalente al anticuerpo se debe hacer en un sitio distinto de su sitio funcional de coagulación. Las composiciones de esta manera se "enlazan" de cualquier manera operativa que permita que cada región realice su función propuesta sin deterioro significativo. De esta manera, el anticuerpo se une a VEGF, y el factor de coagulación promueve la coagulación sanguínea.

C10. Reticuladores Bioquímicos

Además de la información general proporcionada anteriormente, se pueden conjugar anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 a uno o más agentes terapéuticos usando

ciertos reticuladores bioquímicos preferidos. Se usan reactivos reticuladores para formar puentes moleculares que unen conjuntamente grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para enlazar dos diferentes proteínas de una manera gradual, se pueden usar reticuladores hetero-bifuncionales que eliminan la formación homopolimérica indeseada. Los reticuladores hetero-bifuncionales de ejemplo se refieren en la Tabla B.

Tabla B

Reticuladores hetero-bifuncionales

| Ligador | Reactivo hacia | Ventajas y aplicaciones | Longitud de brazo separador después de reticulación |
|---|---|---|---|
| SMPT | Aminas primarias, sulfhidrilos | Mayor estabilidad | 11.2 A |
| SPDP | Aminas primarias, sulfhidrilos | Tiolación, reticulación escindible | 6.8 A |
| LC-SPDP | Aminas primarias, sulfhidrilos | Brazo separador extendido | 15.6 A |
| Sulfo-LC-SPDP | Aminas primarias, sulfhidrilos | Brazo separador extendido, soluble en agua | 15.6 A |

| Ligador | Reactivo hacia | Ventajas y aplicaciones | Longitud de brazo separador después de reticulación |
|---|---|---|---|
| SMCC | Aminas primarias, sulfhidrilos | Grupo reactivo estable de maleimida, conjugación de enzima-anticuerpo, conjugación de hapteno-proteína portadora | 11.6 A |
| Sulfo-SMCC | Aminas primarias, sulfhidrilos | Grupo reactivo estable de maleimida, soluble en agua, conjugación de enzima-anticuerpo | 11.6 A |
| MBS | Aminas primarias, sulfhidrilos | Conjugación de enzima-anticuerpo, conjugación de hapteno-proteína portadora | 9.9 A |
| Sulfo-MBS | Aminas primarias, sulfhidrilos | Soluble en agua | 9.9 A |
| SIAB | Aminas primarias, sulfhidrilos | Conjugación de enzima-anticuerpo | 10.6 A |

| Ligador | Reactivo hacia | Ventajas y aplicaciones | Longitud de brazo separador después de reticulación |
|---|---|---|---|
| Sulfo-SIAB | Aminas primarias, sulfhidrilos | Soluble en agua | 10.6 A |
| SMPB | Aminas primarias, sulfhidrilos | Brazo separador extendido, conjugación de enzima-anticuerpo | 14.5 A |
| Sulfo-SMPB | Aminas primarias, sulfhidrilos | Brazo separador extendido, soluble en agua | 14.5 A |
| EDC/Sulfo-NHS | Aminas primarias, grupos carboxilo | Conjugación hapteno-portador | 0 |
| ABH | Carbohidratos, no selectivo | Reacciona con grupos de azúcar | 11.9 A |

Los reticuladores hetero-bifuncionales contienen dos grupos reactivos: uno que reacciona en general con grupo amina primaria (por ejemplo, N-hidroxi-succinimida) y el otro que reacciona en general con un grupo tiol (por ejemplo, disulfuro de piridilo, maleimidas, halógenos, etc.). a través del grupo reactivo de amina primaria, el reticulador puede reaccionar con los residuos de lisina de

una proteína (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento seleccionado) y a través del grupo reactivo de tiol, el reticulador, ya unido a la primera proteína, reacciona con el residuo de cisteína (grupo sulfhidrilo libre) de la otra proteína (por ejemplo, el coagulante).

Por lo tanto, las composiciones tienen en general, o se derivatizan para tener, un grupo funcional disponible para propósitos de reticulación. Este requisito no se considera que sea limitante ya que se puede usar de esta manera una amplia variedad de grupos. Por ejemplo, se pueden usar grupos de amina primaria o secundaria, grupos de hidracina o hidracina, alcohol de carboxilo, fosfato, o grupos de alquilación para la unión o reticulación.

El brazo separador entre los dos grupos reactivos de un reticulador puede tener longitud variada y composiciones químicas variadas. Un brazo separador más largo permite una mayor flexibilidad de los componentes conjugados en tanto que algunos componentes particulares en el puente (por ejemplo, grupo benceno) pueden conducir a estabilidad adicional al grupo reactivo o una resistencia incrementada del enlace químico a la acción de varios aspectos (por ejemplo, enlace de disulfuro resistente a agentes reductores). También se contempla el uso de separadores peptídicos, tal como L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala.

Se prefiere que el empleo un reticulador que tenga estabilidad razonable en la sangre. Se conoce que numerosos tipos de ligadores que contienen enlaces de disulfuro se pueden emplear de manera exitosa para conjugar anticuerpos y agentes tóxicos o coagulantes. Los ligadores

que contienen un enlace de disulfuro que está estéricamente impedido pueden probar dar mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo la liberación del agente antes de la unión en el sitio de acción. De esta manera, estos ligadores son un grupo preferido de agentes de enlace.

Uno de los reactivos reticuladores más preferidos para el uso en inmunotoxinas es SMPT, que es un reticulador bifuncional que contiene un enlace de disulfuro que está "estéricamente impedido" por un anillo adyacente de benceno y grupos metilo. Se cree que el impedimento estérico del enlace de disulfuro sirve como una función para proteger el enlace del ataque por aniones de tiolato tal como glutationa que se puede presentar en tejidos y sangre, ayudando de este modo a prevenir el desacoplamiento del conjugado antes de la distribución del agente unido al sitio de tumor. Se contempla que el agente de SMPT también se pueda usar en unión con los ligandos biespecíficos de esta invención.

El agente reticulador de SMPT, como con muchos otros reactivos reticuladores conocidos, da la capacidad de reticular grupos funcionales tal como el SH de cisteína o aminas primarias (por ejemplo, el grupo amino épsilon de lisina). Otro posible tipo de reticulador incluye las fenilazidas fotorreactivas hetero-bifuncionales que contienen un enlace escindible de disulfuro tal como sulfosuccinimidil-2-(p-azido-salicilamido)-etil-1,3'-ditiopropionato. El grupo N-hidroxi-succinimidilo reacciona con grupos amino primarios y la fenilazida (en la fotólisis) reacciona de manera no selectiva con cualquier

residuo de aminoácido.

Además de los reticuladores impedidos, también se pueden emplear reticuladores no impedidos, de acuerdo con la presente. Otros reticuladores útiles, no considerados que contengan o generen un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano. El uso de estos reticuladores es bien entendido en la técnica.

Una vez conjugado, el conjugado se separa de los agentes terapéuticos y de selección de objetivo, no conjugados, y de otros contaminantes. Están disponibles un gran número de técnicas de purificación para el uso en la provisión de conjugados de un grado suficiente de pureza para volverlos clínicamente útiles. En general serán de mayor uso los métodos de purificación basados en separación por tamaño, tal como filtración en gel, permeación en gel o cromatografía líquida de alto desempeño. También se pueden usar otras técnicas cromatográficas, tal como separación por Blue-Sepharose.

C11. Ligadores Biológicamente Liberables

Aunque se prefiere que cualquier porción de enlace tendrá estabilidad razonable en la sangre, para impedir la liberación sustancial del agente unido antes de la selección como objetivo del sitio de tumor o enfermedad, en ciertos aspectos, se contempla el uso de enlaces biológicamente liberables y/o separadores o ligadores selectivamente escindibles. Los "enlaces biológicamente liberables" y los "separadores o ligadores selectivamente escindibles" tendrán aún estabilidad razonable en la circulación.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención de esta manera se pueden enlazar a uno o más agentes terapéuticos mediante un enlace biológicamente liberable. Se puede emplear cualquier forma de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, incluyendo anticuerpos intactos, aunque se preferirán fragmentos de ScFv en ciertas modalidades.

Los "enlaces biológicamente liberables" o "enlaces selectivamente hidrolizables" incluyen todos los enlaces que son liberables, escindibles o hidrolizables solamente o de manera preferencial bajo ciertas condiciones. Esto incluye enlaces de disulfuro y trisulfuro y enlaces lábiles a ácido, como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,474,765 y 5,762,918, cada una incorporada en la presente específicamente como referencia.

Se contempla de manera particular el uso de un separador sensible a ácido para la unión de un agente terapéutico o fármaco a un anticuerpo de la invención. En estas modalidades, los agentes terapéuticos o fármacos se liberan dentro de los compartimientos ácidos dentro de una célula. Se contempla que la liberación sensible a ácido pueda ocurrir de manera extracelular, pero aún después de la selección específica de objetivo, preferentemente al sitio tumoral. Ciertos ejemplos actualmente preferidos incluyen anticuerpos humanos enlazados a colquicina o doxorrubicina mediante un separador sensible a ácido. También se contempla la unión mediante las porciones de carbohidrato de los anticuerpos. En estas modalidades, los

agentes o fármacos terapéuticos se liberan dentro de los compartimientos ácidos dentro de una célula.

El anticuerpo humano anti-VEGF también se puede derivatizar para introducir grupos funcionales que permitan la unión de los agentes terapéuticos a través de un enlace biológicamente liberable. El anticuerpo humano de esta manera se puede derivatizar para introducir cadenas laterales que terminan en grupos hidrazida, hidracina, amina primaria o amina secundaria. Se pueden conjugar agentes terapéuticos a través de un enlace de base de Schiff, un enlace de hidrazona o acil-hidrazona o un ligador de hidrazida (patentes de los Estados Unidos números 5,474,765 y 5,762,918, cada una incorporada en la presente como referencia de manera específica).

También, como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,474,765 y 5,762,918, cada una incorporada específicamente en la presente como referencia, el anticuerpo humano anti-VEGF se puede unir de manera operativa a los agentes terapéuticos a través de uno o más enlaces biológicamente liberables que son enlaces sensibles a enzimas, incluyendo enlaces peptídicos, ésteres, amidas, fosfodiésteres y glicósidos.

Los aspectos preferidos de la invención se refieren al uso de ligadores peptídicos que incluyen al menos un primer sitio de escisión para una peptidasa y/o proteinasa que se localiza de manera preferencial dentro de un sitio de enfermedad, particularmente dentro del ambiente tumoral. La distribución mediada por anticuerpo del agente terapéutico unido de esta manera da por resultado la

escisión específicamente dentro del sitio de enfermedad o ambiente tumoral, lo que da por resultado la liberación específica del agente activo. Ciertos ligadores peptídicos incluirán un sitio de escisión que se reconoce por una o más enzimas comprendidas en el remodelado.

Los ligadores peptídicos que incluyen un sitio de escisión para urocinasa, pro-urocinasa, plasmina, plasminógeno, TGFβ, estafilocinasa, trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteinasa, tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, son particularmente preferidos. Las patentes de los Estados Unidos números 6,004,555, 5,877,289 y 6,093,399, se incorporan específicamente en la presente como referencia para el propósito de describir adicionalmente y permitir cómo hacer y usar construcciones de agente de selección de objetivo-agente terapéutico que comprenden enlaces biológicamente liberables y ligadores y péptidos selectivamente escindibles. Las patentes de los Estados Unidos números 5,877,289 y 6,342,221, en particular, se incorporan específicamente en la presente por referencia para el propósito de describir adicionalmente y permitir cómo hacer y usar construcciones de anticuerpo que comprenden un ligador peptídico selectivamente escindible que se escinde por urocinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa o una metaloproteinasa, tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina, dentro de un ambiente tumoral.

Los ligadores peptídicos actualmente preferidos, selectivamente escindibles, son aquellos que incluyen un

sitio de escisión para plasmina o una metaloproteinasa (también conocidas como "metaloproteasas de matriz" o "MMP"), tal como una colagenasa intersticial, una gelatinasa o una estromelisina. Los ligadores peptídicos adicionales que se pueden usar de manera ventajosa en unión con la presente invención incluyen, por ejemplo, las secuencias escindibles de pro-urocinasa, TGFβ, plasminógeno, estafilocinasa, Gelatinasa A, varios colágenos, $\alpha_2$M, PZP, $\alpha_1$M, $\alpha_1I_3$(2J) y $\alpha_1I_3$(27J), incluyendo aquellas secuencias particulares descritas y reivindicadas en la patente de los Estados Unidos número 6,342,221, incorporada específicamente en la presente como referencia.

C12. Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son particularmente útiles en el coaguligando y aspectos anti-angiogénicos combinados de la presente invención. Sin embargo, en general se pueden emplear anticuerpos biespecíficos, en tanto que un brazo se una a VEGF, y el anticuerpo biespecífico se una a un agente terapéutico, en general en un sitio distinto del sitio de unión a antígeno.

En general, también se conoce en la técnica la preparación de anticuerpos biespecíficos. Un método comprende la preparación separada de anticuerpos que tienen especificidad para el antígeno seleccionado como objetivo, por una parte, y (como en la presente) un agente de coagulación en el otro. Se preparan fragmentos $F(ab'\gamma)_2$ pépticos a partir de los dos anticuerpos elegidos, seguido por reducción de cada uno para proporcionar fragmentos $Fab'_{\gamma SH}$ separados. Los grupos SH en uno de los dos

compañeros que se van a acoplar se alquilan entonces con un reactivo de alquilación tal como o-fenilendimaleimida para proporcionar grupos maleimida libres en un compañero. Este compañero entonces se puede conjugar al otro por medio de un enlace de tioéter, para dar el heteroconjugado $F(ab'_Y)_2$ deseado. Se conocen otras técnicas en donde se lleva a cabo la reticulación con SPDP o proteína A, o se prepara una construcción triespecífica.

D. Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenderán en general una cantidad efectiva de al menos un primer anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, disuelto o dispersado en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. También se contemplan productos terapéuticos combinados, y el mismo tipo de composición farmacéutica subyacente se puede emplear tanto para los medicamentos individuales como combinados.

Las frases "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica o de otro modo indeseada, cuando se administran a un animal, o un humano, como sea apropiado. Los usos veterinarios se incluyen igualmente dentro de la invención y las formulaciones "farmacéuticamente aceptables" incluyen formulaciones tanto para uso clínico y/o veterinario.

Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los

solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción y similares. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto con lo que se refiere a cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el ingrediente activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas. Para administración humana, las preparaciones deben cumplir con las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiera por la Oficina FDA de normas Biológicas. En las composiciones también se pueden incorporar ingredientes activos complementarios.

Las formulaciones de "dosis unitaria" son aquellas que contienen una dosis o sub-dosis del ingrediente administrado adaptada para una administración programada, particular. Por ejemplo, las formulaciones de "dosis unitaria" de ejemplo son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria o sub-dosis diaria o una dosis o unidad semanal o una sub-dosis semanal y similares.

D1. Formulaciones Inyectables

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, o inmunoconjugados, de la presente invención, se formularán más frecuentemente para administración parenteral, por ejemplo, formulados para inyección vía las rutas intravenosa, intramuscular, sub-cutánea, transdérmica u otras, incluyendo administración peristáltica e instilación directa en un sitio de tumor o enfermedad (administración de intracavidad). La preparación de una

composición acuosa que contenga este anticuerpo o inmunoconjugado como un ingrediente activo se conocerá por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción. Típicamente, estas composiciones se pueden preparar como productos inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para el uso par preparar soluciones o suspensiones en la adición de un líquido antes de la inyección también se pueden preparar; y también se pueden emulsionar las preparaciones.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de ajonjolí, aceite de cacahuate o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida al grado que exista capacidad de manejo en jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos.

Las composiciones de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, se pueden formular en una composición acuosa estéril en una forma neutral o de sal. Se pueden preparar soluciones como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libre de la proteína), y

aquellos que se forman con ácidos inorgánicos tal como por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tal como acético, trifluoroacético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. También se pueden derivar sales formadas con grupos carboxilo libres, a partir de bases inorgánicas tal como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tal como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Los portadores adecuados incluyen solventes y medios de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de dispersión y/o por el uso de agentes tensioactivos.

Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, todas estas preparaciones deben contener un conservador para impedir el crecimiento de microorganismos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede dar por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede dar por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por

ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Antes o en la formulación, el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, se debe dializar de manera extensa para remover moléculas indeseadas de pequeño peso molecular, y/o liofilizar para formulación más fácil en un vehículo deseado, donde sea apropiado. Se preparan soluciones inyectables estériles al incorporar los agentes activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se desea, seguido por esterilización filtrada. En general, se preparan dispersiones al incorporar los varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente.

En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente activo adicional de una solución anteriormente filtrada estéril del mismo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas de acuerdo con la invención incluirán en general una cantidad del anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, mezclado con un diluyente o excipiente farmacéutico, aceptable, tal como una solución acuosa estéril, para dar un intervalo de concentraciones finales, dependiendo del uso propuesto. Las técnicas de preparación

se conocen en general bien en la técnica como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980, incorporada en la presente como referencia. Se debe apreciar que la contaminación de endotoxinas se debe mantener de manera mínima a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0.5 ng/mg de proteína. Además, para administración humana, las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiera por la Oficina FDA de Normas Biológicas. En la formulación, las soluciones de anticuerpo o de inmunoconjugado se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosis y en una cantidad tal como que sea terapéuticamente efectiva.

D2. Formulaciones de Liberación Sostenida

Se administran fácilmente formulaciones de soluciones de anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, o inmunoconjugados, en una variedad de formas de dosis, tal como el tipo de soluciones inyectables descrito anteriormente, pero también se contemplan otras formas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas u otros sólidos para administración oral, supositorios, pesarios, soluciones nasales o aspersiones, aerosoles, inhalantes, formulaciones tópicas, formas liposomales y similares. El tipo de forma para administración se hará corresponder a la enfermedad o trastorno que se va a tratar.

Se pueden usar, y en general son aplicables las cápsulas farmacéuticas de "liberación lenta" o las

composiciones o preparaciones de "liberación sostenida". En general, las formulaciones de liberación lenta se diseñan para dar un nivel constante de fármaco durante un periodo prolongado y se pueden usar para distribuir un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención. Las formulaciones de liberación lenta se implantan típicamente en la vecindad del sitio de enfermedad, por ejemplo, en el sitio de un tumor.

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado; matrices que están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres; hidrogeles, por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico); poliláctidos; por ejemplo, patente de los Estados Unidos número 3,773,919; copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato; etileno-acetato de vinilo no degradable; copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tal como Lupron Depot$^{MR}$ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido); y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

En tanto que los polímeros tal como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando anticuerpos encapsulados permanecen en el

cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, reduciendo de esta manera la actividad biológica y/o cambiando la inmunogenicidad. Están disponibles estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo comprendido. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación comprende la formación de enlaces S-S intramoleculares a través de intercambio de disulfuro, se logra la estabilización al modificar los residuos de sulfhidrilo, liofilizando de soluciones acidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica, y similares.

D3. Liposomas y Nanopartículas

En ciertas modalidades, también se pueden emplear liposomas y/o nanopartículas con los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 o inmunoconjugados. La formación y uso de liposomas en general se conoce por los expertos en la técnica, como se resume más adelante.

Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman de manera espontánea vesículas de bicapa, concéntricas, multilamelares (también llamadas vesículas multilamelares (MLV). Las MLV tienen en general diámetros desde 25 nm a 4 µm. El tratamiento con ultrasonido de las MLV da por resultado la formación de vesículas unilamelares más pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de

estructuras diferentes de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar de lípido o agua. A relaciones bajas, el liposomas es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, concentración iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas sufren una transición de fase que altera de manera marcada su permeabilidad. La transición de fase comprende un cambio de una estructura ordenada cercanamente empacada, conocida como el estado de gel, a una estructura menos ordenadas, empacada de manera suelta, conocida como el estado fluido. Esto se presenta a una temperatura característica de transición de fase y da por resultado un incremento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con células mediante cuatro mecanismos diferentes: Endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tal como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea por fuerzas hidrófobas o electrostáticas, débiles, no específicas, o por interacciones específicas de los componentes de superficie celular; fusión con la membrana celular plasmática por inserción de la bicapa de lípido de liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares, o subcelulares *o viceversa*, sin ninguna asociación de los contenidos del liposoma. La

variación de la formulación del liposoma puede alterar que mecanismo es operativo, aunque más de uno puede operar al mismo tiempo.

En general las nanocápsulas pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, estas partículas ultrafinas (con un tamaño de alrededor de 0.1 µm) se deben diseñar usando polímeros capaces de ser degradados *in vivo*. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen con estos requisitos se contemplan para el uso en la presente invención, y estas partículas se pueden producir fácilmente.

D4. Formulaciones Oftálmicas

Muchas enfermedades con un componente angiogénico se asocian con el ojo. Por ejemplo, las enfermedades asociadas con neovascularización corneal que se pueden tratar de acuerdo a la presente invención incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, retinopatía de premadures, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de Vitamina A, desgaste por lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis sica de pterigio, enfermedad de sjogrens, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fungoideas, infecciones por herpes simplex, infecciones por herpes zoster, infecciones por protozoarios, sarcoma de

Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis mariginal, trauma, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, sarcoidosis de Wegeners, escleritis, enfermedad de Steven Johnson, queratotomía radial perifigoide, y rechazo de injerto corneal.

Las enfermedades asociadas con neovascularización retinal/coroidal que se pueden tratar de acuerdo a la presente invención incluye, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástica, enfermedad de Pagets, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de carótida, uveitis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematosos sistémicos, retinopatía de premadures, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechets, infecciones que provocan una retinitis o coroiditis, histoplasmosis ocular presuntiva, enfermedad de Bests, miopía, hoyuelos ópticos, enfermedad de Stargarts, pars planitis, desprendimiento retinal crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, trauma y complicaciones de pos-láser.

Otras enfermedades que se pueden tratar de acuerdo a la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades provocadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa, ya sea asociada o no con diabetes.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de

VEGFR2 e inmunoconjugados de la presente invención de esta manera se puede emplear de manera ventajosa en la preparación de composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso como soluciones oftálmicas incluyendo aquellas para administración intravitreal y/o intracameral, ya sea como un agente individual o en combinación con otros fármacos o agentes oculares. Para el tratamiento de cualquiera de los trastornos anteriores u otros, se administrará una composición de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de la invención al ojo u ojos del sujeto en necesidad del tratamiento en la forma de una preparación oftálmica preparada de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, ver, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ava Edición, páginas 1488 a 1501 (Mack Publishing Co., Easton, PA).

La preparación oftálmica contendrá al menos un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 en una concentración de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1 % en peso, preferentemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5 % en una solución, suspensión o ungüento farmacéuticamente aceptable. Se presentarán necesariamente alguna variación en la concentración, dependiendo del compuesto particular empleado, de la condición del sujeto que se va a tratar y similares, y la persona responsable del tratamiento determinará la concentración más adecuadas para el sujeto individual. La preparación oftálmica estará preferentemente en la forma de una solución acuosa estéril que contiene, si se desea, ingredientes adicionales, por ejemplo conservadores,

amortiguadores, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizadores, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que incrementan la viscosidad y similares.

Los conservadores adecuados para el uso en esta solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los amortiguadores adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y preferentemente entre aproximadamente pH 7 y pH 7.5. Los agentes adecuados de tonicidad son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, tal que el equivalente de cloruro de sodio de la solución oftálmica está en el intervalo de 0.9 más o menos 0.2 %.

Los antioxidantes y estabilizadores adecuados incluyen disulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Los agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes adecuados que incrementan la viscosidad incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, petrolato, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares. La preparación oftálmica se administrará tópicamente al ojo del sujeto en necesidad de tratamiento por métodos

convencionales, por ejemplo en la forma de gotas o por baño del ojo en la solución oftálmica.

D5. Formulaciones Tópicas

En sentido más amplio, las formulaciones para administración tópica incluyen aquellas para distribución mediante la boca (bucales) y a través de la piel. Los "sistemas de distribución tópica" también incluyen parches transdérmicos que contienen el ingrediente que se va a administrar. La distribución a través de la piel se puede lograr adicionalmente por iontoforesis o electrotransporte, si se desea.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden los ingredientes en una base saborizada, usualmente sacarosa y goma de acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma de acacia; y lavados bucales que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un portador líquido adecuado.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica a la pila incluyen ungüentos, cremas, geles y pastas que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un portador farmacéutico aceptable. La formulación de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 para uso tópico, tal como en crema ungüento y geles, incluye la preparación de bases oleaginosas o de ungüento solubles en agua, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estas composiciones pueden incluir aceites vegetales, grasas animales, y de manera más preferente,

hidrocarburos semisólidos obtenidos de petróleo. Los componentes particulares usados pueden incluir ungüento blanco, ungüento amarillo, cera de ésteres de cetilo, ácido oleico, aceite de oliva, parafina, petrolato, petrolato blanco, esperma, almidón-glicerita, cera blanca, cera amarilla, lanolina, lanolina anhidra y monoestearato de glicerilo. También se pueden usar varias bases de ungüentos solubles en agua, que incluyen glicol-éteres y derivados, polietilenglicoles, estearato de polioxil 40 y polisorbatos.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada, que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de aspersión que contienen además del ingrediente activo portadores tal como se conocen en la técnica que son apropiados.

D6. Formulaciones Nasales

Se contempla la distribución local mediante las rutas nasal y respiratoria para tratar varias condiciones. Estas rutas de distribución también son adecuadas para distribuir agentes en la circulación sistémica. Las formulaciones de ingredientes activos en los portadores adecuados para administración nasal por lo tanto también se incluyen dentro de la invención, por ejemplo, soluciones nasales, aspersiones, aerosoles e inhalantes. Donde el portador es un sólido, las formulaciones incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo en el

intervalo de 20 a 500 micrones, que se administra, por ejemplo, por inhalación rápida a través del pasaje nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz.

Las formulaciones adecuadas en donde el portador es un líquido son útiles en administración nasal. Usualmente las soluciones nasales son soluciones acuosas diseñadas para ser administradas a los pasajes nasales en gotas o aspersiones y se preparan de modo que son similares en muchos aspectos a secreciones nasales, de modo que se mantiene la acción ciliar normal. De esta manera, las soluciones nasales acuosas usualmente son isotónicas y ligeramente amortiguadas para mantener un pH de 5.5 a 6.5. Además, en la formulación se pueden incluir conservadores antimicrobianos, similares a aquellos usados en preparaciones oftálmicas, y estabilizadores apropiados de fármaco, si se requieren. Se conocen varias preparaciones nasales comerciales e incluyen, por ejemplo, antibióticos y anti-histaminas y se usan para profilaxis asmática.

Las inhalaciones y los inhalantes son preparaciones farmacéuticas diseñadas para la distribución de un fármaco o compuesto en el árbol respiratorio de un paciente. Se administra un vapor o neblina y alcanza el área afectada. Esta ruta también se puede emplear para distribuir agentes en la circulación sistémica. Se pueden administra inhalaciones por las rutas nasal u oral, respiratorias. La administración de soluciones de inhalación solo es efectiva si las gotas son suficientemente finas y de tamaño uniforme de modo que la neblina alcance los bronquios.

Otro grupo de productos, también conocidos como inhalaciones y algunas veces llamados insuflaciones, comprenden fármacos líquidos o en polvo fino que se transportan a los pasajes respiratorios mediante el uso de sistemas especiales de distribución, tal como aerosoles farmacéuticos, que mantienen una solución o suspensión del fármaco en un propulsor de gas licuado. Cuando se liberan a través de una válvula adecuada y adaptador oral, se impulsa una dosis dosificada de la inhalación en el tracto respiratorio del paciente. El tamaño de partícula es de importancia principal en la administración de este tipo de preparación. Se ha reportado que el tamaño óptimo de partícula para penetración en la cavidad pulmonar es del orden de 0.5 a 7 µm. Se producen nieblas finas por aerosoles presurizados y por lo tanto se considera ventajoso su uso.

E. Kits Terapéuticos

Esta invención también proporciona kits terapéuticos que comprenden un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, para el uso en los presentes métodos de tratamiento. Estos kits contendrán en general, en un medio de recipiente adecuado, una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o inmunoconjugado. Los kits también pueden contener otras formulaciones farmacéuticamente aceptables, ya sea para diagnosis/formación de imágenes o terapia combinada. Por ejemplo, estos kits pueden contener cualquiera o más de una variedad de fármacos quimioterapéuticos o

radioterapéuticos; agentes anti-angiogénicos; anticuerpos anti-células tumorales; y/o inmunotoxinas anti-vasculatura tumoral o anti-estroma tumoral, o coaguligandos.

Los kits pueden tener un recipiente individual (medio de recipientes) que contiene el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o inmunoconjugado, con o sin algún componente adicional, o pueden tener recipientes distintos para cada agente deseado. Cuando se proporcionan productos terapéuticos combinados, se puede pre-mezclar unan solución individual, ya sea en una combinación equivalente molar, o con un componente en exceso del otro. De manera alteARNtiva, cada uno del anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o inmunoconjugado y otros componentes de agentes anti-cáncer del kit, se pueden mantener de manera separada dentro de recipientes distintos antes de la administración a un paciente.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida es preferentemente una solución acuosa, con una solución acuosa estéril que es particularmente preferida. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvos secos. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir por la adición de un solvente adecuado. Se contempla que el solvente también se puede proporcionar en otro recipiente.

Los recipientes del kit incluirán en general al menos un frasco, tubo de prueba, matraz, botella, jeringa u otro medio de recipiente, en el cual se puede colocar el

anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, y cualquier otro agente deseado, y de manera preferente, se puede tomar de manera adecuada en alícuotas. Cuando se incluyen componentes separados, el kit también contendrá en general un segundo frasco u otro recipiente en el cual se coloquen estos, permitiendo la administración de dosis designadas, separadas. Los kits también pueden comprender un segundo/tercer medio de recipiente para contener un amortiguador estéril, farmacéuticamente aceptable, u otro diluyente.

Los kits también pueden contener un medio por el cual administrar el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o inmunoconjugado a un animal o paciente, por ejemplo, una o más agujas o jeringas, o aún un gotero para ojos, pipeta, u otro aparato similar, del cual se puede inyectar la formulación en el animal o aplicar a un área enferma del cuerpo. Los kits de la presente invención también incluirán de manera típica un medio para contener los frascos, o similares, y el otro componente, en un confinamiento cerrado para venta comercial, tal como por ejemplo, recipientes plásticos moldeados por soplado o por inyección en los cuales se colocan y retienen los frascos y otros aparato.

F. Terapia Anti-Angiogénica

La presente invención se puede usar para tratar animales y pacientes con angiogénesis anormal, tal como que contribuyen a una variedad de enfermedades y trastornos, ya sea solos o en terapias de combinación. Lo más prevalente y/o clínicamente importante de estos, fuera del campo del

tratamiento de cáncer incluyen artritis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada a la edad, enfermedad de Grave, restenosis vascular, incluyendo restenosis después de angioplastia, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma y glaucoma neovascular. Otros objetivos potenciales para intervención incluyen angiofibroma, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto corneal, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de osler-weber, fibroplasia retrolental de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, varias enfermedades y trastornos inflamatorios diferentes, y aún endometriosis. Las enfermedades y trastornos adicionales que se pueden tratar por la invención, y las bases unificantes de estos trastornos angiogénicos, se exponen a continuación.

Una enfermedad en la cual está comprendida la angiogénesis es artritis reumatoide, en donde los vasos sanguíneos en el forro sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies de oxígeno reactivo que conducen al crecimiento de paño y destrucción de cartílago. Los factores comprendidos en la angiogénesis pueden contribuir de manera activa, a, y ayudar a mantener, el estado crónicamente inflamado de la artritis reumatoide. Los factores asociados con angiogénesis tienen también un papel en osteoartritis, que contribuye a la destrucción de la articulación.

Harada et al. (1998, incorporado específicamente en la presente como referencia) mostró que VEGF está comprendido en la patogénesis de artritis reumatoide, y adicionalmente, que la medición de la concentración en suero de VEGF es un método útil no invasivo para monitorizar la actividad de la enfermedad de artritis reumatoide. Esto soporta los usos terapéuticos y de diagnóstico de la presente invención en unión con artritis reumatoide.

Nagashima et al. (1999, incorporada específicamente en la presente como referencia) describieron los efectos inhibitorios de fármacos anti-reumáticos en VEGF en células sinoviales reumatoides cultivadas. Se expresa de manera constitutiva VEGF en el sinovio de artritis reumatoide. El fármaco anti-reumático conocido, bucilamina (BUC), se mostró que incluye dentro de su mecanismo de acción la inhibición de la producción de VEGF por células sinoviales. De esta manera, los efectos anti-reumáticos de BUC se medían por supresión de angiogénesis y proliferación sinovial en el sinovio artrítico a través de la inhibición de la producción de VEGF por células sinoviales. El uso de la presente invención como una terapia anti-artrítica se soporta por las acciones inhibitorias de VEGF de este producto terapéutico existente.

Otro ejemplo de una enfermedad mediada por angiogénesis es enfermedad neovascular ocular. Esta enfermedad se caracteriza por invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo, tal como la retina o

córnea. Es la causa más común de ceguera y está comprendida en aproximadamente veinte enfermedades oculares. En la degeneración macular relacionada a la edad, los problemas visuales asociados se provocan por un crecimiento hacia adentro de capilares corioidales a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular por debajo del epitelio de pigmento retinal. También se asocia daño angiogénico con retinopatía diabética, retinopatía de premadures, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental.

Otras enfermedades asociadas con neovascularización corneal incluyen, pero no se limitan a, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, desgaste por lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis sica de pterigio, enfermedad de sjogrens, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración de lípidos, quemaduras químicas, ulcersa bacterianas, úlceras fungoideas, infecciones por herpes simplex, infecciones por herpes zoster, infecciones por protozoarios, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis mariginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, trauma, sarcoidosis de Wegeners, escleritis, enfermedad de Steven Johnson, queratotomía radial perifigoide, y rechazo de injerto corneal.

Las enfermedades asociadas con neovascularización retinal/coroidal incluyen, pero no se limita a, retinopatía diabética, degeneración macular, incluyendo degeneración macular relacionada a la edad (AMD), anemia de células

falsiformas, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástica, enfermedad de Pagets, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de carótida, uveitis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematosos sistémicos, retinopatía de premadures, enfermedad de Eales, enfermedad de Bechets, infecciones que provocan retinitis o coroiditis, histoplasmosis ocular presuntiva, enfermedad de Bests, miopía, hoyuelos ópticos, enfermedad de Stargarts, pars planitis, desprendimiento retinal crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, trauma y complicaciones de pos-láser.

Con respecto a la neovascularización coroidal, tal como aquella asociada con degeneración macular, AMD y otras enfermedades oculares, los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención son particularmente bien adecuados para el uso en el tratamiento. Esto es, en parte, debido a que bloquean de manera sustancial la unión por VEGF a VEGFR2 sin bloquear de manera sustancial la unión de VEGF a VEGFR1 y los beneficios resultantes en el ojo (Nozaki et al, 2006), que resalta otra ventaja de la presente invención con respecto a los tratamientos existentes anti-VEGF, tal como, por ejemplo, Avastin y el producto relacionado Lucentis$^{MR}$.

Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) enfermedades provocadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa.

La inflamación crónica también comprende

angiogénesis patológica. Los estados de enfermedad tal como colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn muestran cambios histológicos con el crecimiento hacia adentro de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos inflamados. La bartonelosis, una infección bacteriana encontrada en Sudamérica, puede dar por resultado un cambio crónico que se caracteriza por proliferación de células endoteliales vasculares.

Otro papel patológico asociado con angiogénesis se encuentra en la aterosclerosis. Se ha mostrado que las placas formadas dentro del lumen de los vasos sanguíneos tienen actividad estimuladora angiogénica. La expresión de VEGF en lesiones ateroscleróticas coronarias humanas se demostró por Inoue et al. (1998, incorporados específicamente en la presente como referencia). Esto evidencia el significado patofisiológico de VEGF en el progreso de aterosclerosis coronaria humana, así como en procesos de recanalización en enfermedades coronarias obstructivas. La presente invención proporciona un tratamiento efectivo para estas condiciones.

Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes de la niñez es la hemangioma. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos y retroceden sin intervención. En casos más severos, los tumores progresan a formas cavernosas e infiltrantes grandes y crean complicaciones clínicas. Las formas sistémicas de las hemangiomas, las hemangiomatosas, tienen una alta proporción de mortalidad. Existen hemangiomas resistentes a terapia que no se pueden tratar con los productos

terapéuticos actualmente en uso.

La angiogénesis también es responsable del daño encontrado en enfermedades hereditarias tal como enfermedad de Osler-Weber-Rendu, o telangiectasia hemorrágica hereditaria. Estas es una enfermedad heredada, caracterizada por múltiples angiomas pequeños, tumores de vasos sanguíneos o linfoides. Se encuentran los angiomas en la piel y membranas mucosas, frecuentemente acompañados por epistaxis (hemorragias nasales) o sangrado gastrointestinal y algunas veces con fistula arteriovenoa hepática o pulmonar.

La angiogénesis también está involucrada en procesos fisiológicos normales tal como reproducción y curación de heridas. La angiogénesis es paso importante en la ovulación y también en la implantación de la blástula después de la fertilización. La prevención de la angiogénesis se puede usar para inducir amenorrea, para bloquear la ovulación o para impedir la implantación por la blástula.

En la curación de heridas. Una reparación excesiva o fibroplasia puede ser un efecto secundario perjudicial de los procedimientos quirúrgicos y se puede provocar o exacerbar por la angiogénesis. Las adhesiones son una complicación frecuente de la cirugía y conducen a problemas tal como obstrucción del intestino delgado.

Las enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable también se pueden tratar por la presente invención. Estas incluyen edema asociad con tumores cerebrales, ascitis asociado con malignidades,

síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericardiaca, y efusión pleural, como se describe en la WO 98/16551, incorporada específicamente en la presente como referencia.

Cada una de las enfermedades y trastornos anteriores, junto con todo los tipos de tumores, como se describe en las siguientes secciones, se pueden tratar de manera efectiva por la presente invención de acuerdo con el conocimiento en la técnica, como se describe por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 5,712,291 (incorporada específicamente en la presente como referencia), que unifica los beneficios que resultan de la aplicación de estrategias anti-agionénicas al tratamiento de enfermedades angiogénicas. Además, la patente de los Estados Unidos No. 6,524,583 se incorpora específicamente en la presente como referencia para propósitos incluir describir adicionalmente y permitir el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos usando un anticuerpo anti-VEGF.

Los anticuerpos humanos y/o inmunoconjugados de la invención se utilizan más frecuentemente en el tratamiento de tumores. Los tumores en los cuales la angiogénesis es importante incluyen tumores malignos, y tumores benignos, tal como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piogénicos. La angiogénesis es particularmente prominente en formación de tumores sólidos y metástasis. Sin embargo, la angiogénesis también se asocia con tumores portados en sangre, tal como leucemias, y varias enfermedades neoplásticas agudas o crónicas de la médula ósea en la cual se presenta proliferación no

restringida de células sanguíneas blancas, usualmente acompañado por anemia, coagulación sanguínea deteriorada y agrandamiento de los nódulos linfáticos, hígado, y vaso. La angiogénesis también juega un papel en las anormalidades en la médula ósea que dan lugar a tumores tipo leucemia.

La angiogénesis es importante en dos etapas de la metástasis tumoral. En la vascularización del tumor primario, la angiogénesis permite que las células entren a la corriente sanguínea y circulen a todo lo largo del cuerpo. Después de que las células tumorales han dejado el sitio primario, y se han asentado en el sitio secundario de metástasis, puede presentarse la angiogénesis antes de que el nuevo tumor pueda crecer y extenderse. Por lo tanto, la prevención de la angiogénesis puede prevenir la metástasis de tumores y contener el crecimiento neoplástico en el sitio primario, permitiendo el tratamiento por otros productos terapéuticos, particularmente construcciones de agentes terapéutico-agente de solución de objetivo (ver posteriormente).

Los métodos de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, o inmunoconjugado, proporcionados por esta invención, de esta manera son ampliamente aplicables al tratamiento de cualquier tumor maligno que tiene un componente vascular. Al usar los anticuerpos y/o inmunoconjugados de la invención en el tratamiento de tumores, particularmente tumores malignos vascularizados, los agentes se pueden usar solos o en combinación con, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos, apoptóticos, anti-angiogénicos y/o inmunotoxinas o

coaguligandos.

Los tumores vascularizados típicos para el tratamiento son los tumores sólidos, particularmente carcinomas que requieren un componente vascular para la provisión de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos de ejemplo que se pueden tratar usando la invención incluyen, pero no se limita a, carcinomas del pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tractor biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, y similares. La WO 98/45331 también se incorpora en la presente como referencia para ejemplificar adicionalmente la variedad de tipo de tumor que se pueden tratar de manera efectiva usando un anticuerpo anti-VEGF.

El conocimiento del papel de la angiogénesis en el mantenimiento y metástasis de tumores ha conducido a un indicador prognóstico para cánceres tal como cáncer de mama. La cantidad de neovascularización encontrada el tumor primario se determinó al contar la densidad de microvasos en el área de la neovascularización más intensa en el carcinoma invasor de mama. Se encontró un alto nivel de densidad de microvasos que correlacionan con la recurrencia del tumor. El control de la angiogénesis por las terapias de la presente invención reducirá o anulará la recurrencia de tumores.

La presente invención se contempla para el uso en el tratamiento de cualquier paciente que presente un tumor

sólido. En vista de las propiedades específicas de las composiciones de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueador de VEGFR2, los productos terapéuticos de la presente invención tendrán efectos secundarios reducidos. Las ventajas particulares darán por resultado el mantenimiento o mejora de las respuestas inmunitarias del hospedador contra el tumor, y en la carencia de efectos adversos en el tejido óseo. La invención de esta manea será la terapia anti-angiogénica de elección para el tratamiento de cánceres pediátricos y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, osteoporosis, y otras deficiencias óseas.

Aunque se pueden tratar por la invención todas las malignidades y tumores sólidos, los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, no conjugados, de esta invención, se contemplan de manera particular para el uso en el tratamiento de pacientes con tumores más angiogénicos, o pacientes en riesgo de metástasis.

La presente invención también se propone como un tratamiento preventivo o profiláctico. Estos aspectos de la invención incluyen la capacidad de la invención para tratar pacientes que presentan un tumor primario quienes pueden tener tumores metastáticos, o células tumorales en las etapas tempranas de la siembra de tumores metastáticos. Como una estrategia anti-angiogénesis, la presente invención también se puede usar para impedir el desarrollo tumoral en sujetos en riesgo moderado o alto de desarrollar un tumor, como base para pruebas de prognóstico y/o parientes cercanos que padecen de un cáncer hereditario.

Las formas conjugadas o de inmunotoxina de los anticuerpos humanos anti-VEGF o bloqueadores de VEGFR2 de la invención se contemplan de manera particular para el uso en la destrucción o reducción de tumores sólidos. Estos aspectos de la invención se pueden usar en unión con los anticuerpos no conjugados, anti-angiogénicos de la invención, con otros planteamientos anti-angiogénicos.

Se apreciará fácilmente por aquellos expertos en la técnica que el inmunoconjugado y las formas de profármaco de los presentes métodos de tratamiento tienen la ventaja distinta de proporcionar un agente terapéutico único con dos propiedades: la propiedad anti-angiogénica inherente del anticuerpo y la propiedad terapéutica del agente unido (por ejemplo, citotóxico, coagulante, apoptótico, etc). Las formas de tratamiento de profármaco y conjugada de los presentes anticuerpos tiene de esta manera una utilidad increíblemente amplia a todo lo largo del campo de tratamiento de cáncer.

La guía proporcionada en la presente con respecto a los pacientes más adecuados para el uso en unión con los diferentes aspectos de la presente invención se propone como enseñanza que pueden existir ciertos perfiles de pacientes con la selección de pacientes para el tratamiento por la presente invención. La pre-selección de ciertos pacientes, o categorías de pacientes, de ninguna manera anula la utilidad de la presente invención en unión con el tratamiento de todos los pacientes que tienen un tumor vascularizado, u otra enfermedad angiogénica como se describe anteriormente. Una consideración adicional es el

hecho que la agresión en el tumor proporcionado por la invención puede predisponer al tumor a tratamiento terapéutico adicional tal que el tratamiento subsiguiente dé por resultado efecto sinérgico completo o conduzca a una remisión o cura total.

No se cree que ningún tipo particular de tumor se deba excluir del tratamiento, usando la presente invención. Sin embargo, el tipo de células tumorales puede ser pertinente al uso de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos, particularmente agentes quimioterapéuticos e inmunotoxinas anti-célula tumoral. Tanto los aspectos conjugados como no conjugados de las presentes terapias incluirán un efecto anti-angiogénico que inhibirá la proliferación de la vasculatura tumoral. Los aspectos de tratamiento de profármaco y conjugado destruirá adicionalmente o opacará la vasculatura tumoral. Puesto que la vasculatura es sustancial o completamente la misma en todos los tumores sólidos, la presente metodología se entenderá que es amplia o completamente aplicable al tratamiento de todos los tumores sólidos, a pesar del fenotipo o genotipo particular de las células tumorales mismas.

Las dosis terapéuticamente efectivas de anticuerpos humanos anti-VEGD, bloqueadores de VEGFR2, o construcciones de inmunoconjugado son fácilmente determinables usando datos de un modelo de animal, por ejemplo como se muestra en los estudios detallados en la presente. Se usan frecuentemente animales experimentales que tienen tumores sólidos, para optimizar dosis

terapéuticas apropiadas antes de traducirla a un ambiente clínico. Estos modelos se conoce que son muy confiables en predecir estrategias anti-cáncer efectivas. Por ejemplo, se usan ampliamente en la prueba preclínica ratones que tienen tumores sólidos, tal como los usados en los ejemplos. Los inventores han usado estos modelos de ratón aceptados en la técnica para determinar intervalos de trabajo de los agentes terapéuticos que dan efectos anti-tumor benéficos con toxicidad mínima.

Al usar los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 no conjugados en terapias anti-angiogénicas, también se pueden extraer otros datos publicados a fin de ayudar en la formulación de las dosis para tratamiento clínico. Por ejemplo, aunque los anticuerpos de la presente invención tienen ventajas distintas con respectos a aquellos de la técnica, la información en la literatura con respecto al tratamiento con otros anticuerpos anti-VEGF aún se puede usar en combinación con los datos y la enseñanza en la presente solicitud para diseñar y/o optimizar protocolos y dosis de tratamiento.

Por ejemplo, Borgstrom et al. (1999), incorporada específicamente en la presente como referencia, describieron la importancia de VEGF en la angiogénesis de cáncer de mama *in vivo* usando MAb A4.6.1. La forma humanizada del anticuerpos A4.6.1 (Avastin, bevacizumab) se ha probado para uso clínico (Hurwitz et al., 2004). Puesto que los anticuerpos humanos de esta invención exhibieron respuestas anti-tumorales equivalentes o aún mejoradas en

estudios comparativos con A4.6.1/Avastin, esto anticuerpos también tendrán utilidad significativa en el tratamiento de cáncer en humanos, incluyendo cáncer de mama. Los inventores se dieron cuenta adicionalmente, como se apreciará por los expertos en la técnica, que los pacientes con cáncer de mama son típicamente mujeres en los grupos de edad intermedia o posterior, donde también son aparentes cuestiones con respecto a la osteoporosis. Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención de esta manera tendrán la ventaja adicional de no provocar ningún afecto adverso en el metabolismo óseo, y se preferirán para el uso en pacientes con cáncer de mama que tienen o están en riesgo de desarrollar osteoporosis.

El mismo tipo de beneficios hace a los productos de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, los fármacos preferidos para el tratamiento de cánceres pediátricos. En los niños con cáncer, es evidente la necesidad de continuar el crecimiento óseo saludable y sustancial. Puesto que los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 no deteriorarán de manera sustancial la actividad de los osteoclastos y los condroclastos, que son importantes en el desarrollo óseo, estos anticuerpos tendrán ventajas importantes con respecto a otros anticuerpos, tal como Avastin.

Borgstrom et al. (1999), incorporado específicamente en la presente como referencia, también reportaron que MAb A4.6.1 dio por resultado regresión significativa de tumores cuando se usó en combinación con doxorubicina. Esto soporta además el uso combinado de los

anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 y agentes citotóxicos o quimioterapéuticos convencionales para lograr resultados clínicos significativos en el tratamiento de una variedad de cánceres. Se contemplan combinaciones de profármaco de doxorubicina no conjugada y doxorubicina.

Ferrara y colaboradores también reportaron la eficiencia y concentración-respuesta de un anticuerpo monoclonal murino anti-VEGF en ratones que tienen tumor y la extrapolación a tratamiento humano (Mordenti et al., 1999, específicamente incorporado en la presente como referencia). Los estudios se diseñaron para evaluar la relación o concentración-respuesta del anticuerpo monoclonal murino anti-VEGF de modo que una concentración plasmática eficaz de la forma humanizada recombinante del anticuerpo se puede estimar en pacientes con cáncer. Mordenti et al. (1999) concluyeron que se logró supresión celular satisfactoria en ratones de nudos usando dosis del anticuerpo murino que se pueden aplicar fácilmente al sistema humano a fin de definir regímenes de dosificación clínica efectivos para mantener un anticuerpo terapéutico para uso humano en el intervalo eficaz requerido. Por consiguiente, los datos de los presentes modelos de ratón aceptados en la técnica también se pueden traducir a dosis humanas apropiadas usando el tipo de análisis reportado en Mordenti et al. (1999), además de las técnicas conocidas por el experto en la técnica como se describe en la presente.

Los resultados de las evaluaciones preclínicas de

seguridad de una forma humanizada, recombinante del anticuerpo anti-VEGF de Genentech, en monos (Ryan et al, 1999, incorporada específicamente en la presente como referencia) sirven para ejemplificar las desventajas con ese producto terapéutico candidato, particular. Aunque el anticuerpo tiene actividad farmacológica en este animal, los monos en estos estudios exhibieron displasia fiseal caracterizada por un incremento relacionado a la dosis en condrocitos hipertrofiados, formación de placa ósea subcondral e inhibición de invasión vascular de la placa de crecimiento. No serán evidentes desventajas en el uso de los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, que no inhiban la unión y señalización de VEGF en condroclastos y condrocitos, que se media por VEGFR1.

Los datos de un estudio adicional en la farmacocinética preclínica, aumento en escala interespecie y distribución en tejido del anticuerpo anti-VEGF monoclonal, humanizado de Genentech se reportó por Lin et al. (1999, incorporada específicamente en la presente como referencia). Estos estudios se llevaron a cabo en ratones, ratas, monos y conejos, esto último que usa el anticuerpo marcado con $^{125}I$. Los datos farmacocinéticos de ratones, ratas y monos se usaron para predecir la farmacocinética del anticuerpo de contraparte humanizado usando aumento en escala alométrico en humanos. Por consiguiente se puede desarrollar información apropiada de dosis para el tratamiento de condiciones patológicas humanas, tal como artritis reumatoide, neovascularización ocular y cáncer.

La versión humanizada del anticuerpo anti-VEGF

A4.6.1 (Avastin, bevacizumab) ahora está probada para uso clínico (Hurwitz et al., 2004, incorporado en la presente como referencia). Por lo tanto, estos datos clínicos también se pueden considerar como una fuente de referencia cuando se diseñan dosis terapéuticas del presente tratamiento de anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueador de VEGFR2.

La presente invención muestra que los nuevos anticuerpos humanos son tan efectivos como A4.6.1/Avastin en estudios en ratones que tienen tumor, aunque es una ventaja a la especificidad para inhibir solo acciones mediadas por VEGFR2 del VEGF también se incorpora en la presente la WO 98/45331 como referencia para ejemplificar adicionalmente las dosis de anticuerpos anti-VEGF humanizados que se pueden usar en el tratamiento.

En términos de usar anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, conjugados, en terapia tumoral, se puede hacer referencia a la literatura científica y de patentes del éxito de distribuir una amplia variedad de productos terapéuticos a la vasculatura tumoral para lograr un efecto benéfico. A manera de ejemplo, cada una de las patentes de los Estados Unidos números 5,855,866; 5,877,289; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555; 5,776,427; 6,004,554; 6,036,955; y 6,093,399 se incorporan en la presente como referencia para el propósito de describir adicionalmente el uso de estas construcciones de agente terapéutico-agente de selección de objetivo. En el presente caso, las construcciones de agente terapéutico-agente de selección de objetivo incluyen porciones de

agente de selección de objetivo que ejercen un efecto anti-angiogénico, que aumentará o de otro modo mejorará la actividad anti-tumoral del agente terapéutico unido.

Como se conoce en la técnica, hay objetivos realistas que se pueden usar como una guía en unión con la prueba pre-clínica antes de proseguir al tratamiento clínico. Sin embargo, en vista del progreso de otros anticuerpos anti-VEGF en el escenario clínico, los efectos anti-tumorales demostrados en modelos aceptados, mostrados en la presente, y la seguridad mejorada de las presentes estrategias, la presente invención proporciona un producto terapéutico con un rápido camino al tratamiento clínico. De esta manera, se puede emplear la prueba pre-clínica para seleccionar los anticuerpos, dosis o combinaciones más ventajosas.

Cualquier dosis de anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o de inmunoconjugado, o medicamento combinado, que dé por resultado cualquier efecto anti-angiogénico, consistentemente detectable, inhibición de metástasis, destrucción de vasculatura tumoral, trombosis tumoral, necrosis y/o efecto anti-tumoral general definirá una invención útil. La presente invención también puede ser efectiva contra vasos en etapas posteriores del tumor, por ejemplo, para seleccionar como objetivo al menos un subconjunto de los vasos drenantes, particularmente como citocinas liberadas del tumor estarán actuando en estos vasos, cambiando su perfil antigénico.

También se entenderá que aún en circunstancias donde los efectos anti-angiogénicos y/o tumorales de la

dosis de anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, o terapia combinada, son hacia el extremo inferior del intervalo terapéutico propuesto, puede ser que esta terapia aún sea igualmente o aún más efectiva que otras terapias conocidas en el contexto del paciente u objetivo tumoral particular. Desdichadamente, es evidente a un doctor que ciertos tumores y condiciones no se pueden tratar de manera efectiva en el largo plazo o plazo intermedio, pero que no anula la utilidad de la presente terapia, particularmente donde sea al menos tan cercanamente efectiva como las otras terapias propuestas en general.

Al diseñar las dosis apropiadas de las construcciones de anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o inmunoconjugado, o productos terapéuticos combinados, para el tratamiento de tumores vascularizados, se puede extrapolar fácilmente de los estudios en animales descritos en la presente y del conocimiento en la literatura a fin de arribar a las dosis precisas para administración clínica. Para lograr una conversión de dosis de animal a humano, se dará cuenta de la masa de los agentes descritos por masa unitaria del animal experimental, y de manera preferente, se dará cuenta de las diferencias en el área superficial corporal ($m^2$) entre el animal experimental y el paciente humano. Todos estos cálculos son bien conocidos y de rutina para aquellos expertos en la técnica.

Por ejemplo, tomando las dosis exitosas en los estudios de ratón, y al aplicar cálculos normales con base

en la masa y área superficial, las dosis efectivas para el uso en pacientes humanos estarían entre aproximadamente 1 $mg/m^2$ y aproximadamente 1000 $mg/m^2$, preferentemente, entre aproximadamente 50 $mg/m^2$ y 500 $mg/m^2$, y de manera más preferente, entre aproximadamente 10 $mg/m^2$ y aproximadamente 100 $mg/m^2$. Estas dosis son apropiadas para los anticuerpos humanos desnudos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 y los inmunoconjugados humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, aunque las dosis se prefieren para el uso en unión con anticuerpos desnudos o no conjugados para el uso como anti-angiogénicos.

Por consiguiente, usando esta información, los inventores contemplan que las dosis bajas útiles de los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, o inmunoconjugados, para administración humana serán de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o de aproximadamente 50 $mg/m^2$; y que las dosis altas útiles de estos anticuerpos o inmunoconjugados para administración humana serán de aproximadamente 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 925, 950, 975 o de aproximadamente 1000 $mg/m^2$. Las dosis intermedias útiles de los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, o inmunoconjugados, para administración humana se contemplan que son cualquier dosis entre los intervalos bajo y alto, tal como de aproximadamente 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550 o de aproximadamente 575 $mg/m^2$ o poco más o menos.

Se contempla cualquier intervalo particular usando cualquiera de las dosis de ejemplo citadas

anteriormente o cualquier valor intermedio entre los intervalos señalados, particulares. Donde se usen inmunoconjugados humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, también se entenderá que los inmunoconjugados coagulantes se pueden usar en general a mayores dosis que los inmunoconjugados de toxina.

En general, se preferirán intervalos de dosis de entre aproximadamente 10-100 $mg/m^2$, aproximadamente 10-90 $mg/m^2$, aproximadamente 10-80 $mg/m^2$, aproximadamente 20-100 $mg/m^2$, aproximadamente 20-90 $mg/m^2$, aproximadamente 20-80 $mg/m^2$, aproximadamente 30-100 $mg/m^2$, aproximadamente 30-90 $mg/m^2$, aproximadamente 30-80 $mg/m^2$, aproximadamente 15-100 $mg/m^2$, aproximadamente 25-100 $mg/m^2$, aproximadamente 35-100 $mg/m^2$, aproximadamente 15-90 $mg/m^2$, aproximadamente 25-90 $mg/m^2$, aproximadamente 35-90 $mg/m^2$, o poco más o menos de inmunoconjugados o anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2. No obstante de estos intervalos señalados, se entenderá que, dados los parámetros y la guía detallada presentada en la presente, dentro de la presente invención se abarcarán variaciones adicionales en los intervalos activos u óptimos.

Por lo tanto, se entenderá que dosis menores pueden ser más apropiadas en combinación con otros agentes, y que aún se pueden tolerar dosis superiores, particularmente dada la seguridad mejorada de los inmunoconjugados y anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2. El uso de anticuerpos humanos (y opcionalmente, proteínas coagulantes o anti-angiogénicas humanas) vuelve a la presente invención aún más segura para

uso clínico, reduciendo adicionalmente las probabilidades de toxicidad significativa o efectos secundarios en tejidos saludables.

La intención de los regímenes terapéuticos de la presente invención es producir en general efectos anti-tumorales significativos en tanto que aún se mantiene la dosis por abajo de los niveles asociados con toxicidad inaceptable. Además de variar la dosis misma, el régimen de administración también se puede adaptar para optimizar la estrategia de tratamiento. Un protocolo de tratamiento es administrar entre aproximadamente 1 $mg/m^2$ y aproximadamente 1000 $mg/m^2$, preferentemente, entre aproximadamente 50 $mg/m^2$ y 50 $mg/m^2$, y de manera más preferente, entre aproximadamente 10 $mg/m^2$ y aproximadamente 100 $mg/m^2$ del inmunoconjugado o anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o cóctel terapéutico que contiene de aproximadamente 1 a 3 veces por semana, preferentemente por administración intravenosa o intramuscular, y de manera más preferente, de manera intravenosa.

Al administrar las dosis particulares, se proporcionará preferentemente una composición farmacéuticamente aceptable (de acuerdo a las normas de la FDA de esterilidad, pirogenicidad, pureza y seguridad general) al paciente de manera sistemática. En general, se prefiere inyección intravenosa. También se contempla infusión continua durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 ó 2 horas o un poco más o menos.

Naturalmente, antes del uso extendido, se

llevarán a cabo ensayos clínicos. Los varios elementos para llevar a cabo un ensayo clínico, que incluyen monitoreo y tratamiento de pacientes, se conocerán por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción. La siguiente información se está presentando como una guía general para el uso en el establecimiento de estos ensayos.

Los pacientes elegidos para los estudios de tratamiento con anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 habrán fallado en responder al menos un transcurso de terapia convencional, y tendrán enfermedad objetivamente medible como se determina por examen físico, técnicas de laboratorio, y/o procedimientos radiográficos. Se debe detener cualquier quimioterapia al menos dos semanas antes de entrar en el estudio. Cuando se empleen anticuerpos monoclonales murinos o porciones de anticuerpo, los pacientes no deben tener historia de alergia a inmunoglobulina de ratón.

Se encontrarán ciertas ventajas en el uso de un catéter venoso central implantado con un orificio de triple lumen. El anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 se debe filtrar, por ejemplo, usando un filtro de 0.22 µ, y diluir de manera apropiada, tal como con solución salina, o un volumen final de 100 ml. Antes del uso, la muestra de prueba también se debe filtrar de una manera similar, y su concentración valorada antes y después de la filtración al determinar la $A_{280}$. La recuperación esperada debe estar dentro del intervalo de 87 % a 99 %, y entonces se debe dar cuenta de los ajustes para la pérdida de proteína.

Los conjugados o anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 se pueden administrar durante un periodo de aproximadamente 4-24 horas, con cada paciente que recibe 2-4 infusiones en intervalos de 2-7 días. La administración también se puede realizar a una velocidad estable de infusión durante un periodo de 7 días. La infusión dada a cualquier nivel de dosis debe ser dependiente de cualquier toxicidad observada. Por lo tanto, si se alcanzó toxicidad Grado II después de una sola infusión, o en un periodo particular de tiempo para una infusión de velocidad estable, se deben retener las dosis adicionales o la infusión de velocidad estable de tener a menos que mejore la toxicidad. Se deben administrar dosis crecientes del anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, a los grupos de pacientes hasta que aproximadamente el 60 % de los pacientes muestre toxicidad Grado III o IV inaceptable en cualquier categoría. Las dosis que son 2/3 de este valor se definen como la dosis segura.

El examen físico, mediciones tumorales, y pruebas de laboratorio por supuesto se deben realizar antes del tratamiento y en intervalos de hasta 1 mes posterior. Las pruebas de laboratorio deben incluir cuentas sanguíneas completas, creatinina serosa, creatinina-cinasa, electrolitos, urea, nitrógeno, SGOT, bilirrubina, albúmina y proteína serosa total. Las muestras de suero tomadas a 60 días después del tratamiento se deben evaluar por radioinmunoensayo para la presencia del producto terapéutico administrado, y los anticuerpos contra cualquier porción del mismo. Los análisis inmunológicos de

los sueros, usando cualquier ensayo normal tal como por ejemplo, un ELISA o RIA, permitirán que se evalúe la farmacocinética y la depuración del anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2.

Para evaluar las respuestas anti-tumorales, los pacientes se deben examinar a las 48 horas a una 1 semana y nuevamente a los 30 días después de la última infusión. Cuando esté presente enfermedad palpable, se deben medir dos diámetros perpendiculares de todas las masas diariamente durante el tratamiento, en el espacio de 1 semana después del término de la terapia, y a los 30 días. Para medir la enfermedad no palpable, se pueden realizar exploraciones CT en serie a intervalos de 1 cm a todo lo largo del pecho, abdomen y pelvis a las 48 horas a 1 semana y nuevamente a los 30 días. También se deben evaluar de manera histológica las muestras de tejido, y/o por citometría de flujo, usando biopsias de los sitios de enfermedad o aún muestras sanguíneas o de fluido, si es apropiado.

Las repuestas clínicas se pueden definir por medición aceptable. Por ejemplo, se puede definir una respuesta completa por la desaparición de todo el tumor medible 1 mes después del tratamiento. En tanto que una respuesta parcial se puede definir por una reducción de 50 % o mayor de la suma de los productos de diámetros perpendiculares de todos los nódulos tumorales evaluables 1 mes después de tratamiento, sin sitios tumorales que muestren agrandamiento. De manera similar, se puede definir una respuesta mezclada por una reducción del

producto de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles por 50 % o mayor 1 mes después del tratamiento, con progreso en uno o más sitios.

En vista de los resultados de los ensayos clínicos, tal como aquellos descritos anteriormente, se puede formular un régimen de tratamiento aún más preciso. Aún así, puede ser necesaria posteriormente alguna variación en la dosis dependiendo de la condición del sujeto que se trate. El facultativo responsable de la administración será capaz, en vista de la presente descripción, de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual. Esta optimización y ajuste se lleva a cabo por rutina en la técnica y de ninguna manera refleja una cantidad indebida de experimentación.

G. Terapias de Combinación

Ya sea usada para tratar enfermedades angiogénicas, tal como artritis, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada a la edad, enfermedad de Grave, restenosis vascular, hemangioma y glaucoma neovascular (u otras enfermedades descritas anteriormente), o tumores sólidos, la presente invención se puede combinar con otras terapias.

Los métodos de tratamiento con anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, de la presente invención, se pueden combinar con cualquier otro método en general empleado en el tratamiento del tumor, enfermedad o trastorno particular que exhibe el paciente. En tanto que un planteamiento terapéutico particular no se sabe que sea perjudicial a la condición del paciente en sí mismo, y no

contrarreste de manera significativa el tratamiento con anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, se contempla su combinación con la presente invención.

En relación con el tratamiento de tumores sólidos, la presente invención se puede usar en combinación con planteamientos clásicos, tal como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. La invención proporciona por lo tanto terapias combinadas en las cuales se usan construcciones de anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, de manera simultánea con, antes de, o después de la cirugía o tratamiento de radiación; o se administran a pacientes con, antes, o después de agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos o anti-angiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o coaguligandos dirigidos al objetivo.

Se prefiere de manera particular el uso combinado de la invención con radioterapia, productos radioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis y fármacos anti-tubulina. Se han descrito anteriormente muchos ejemplos de estos agentes en unión con los inmunoconjugados de la presente invención. También se puede usar de manera separada cualquiera de los agentes descritos inicialmente para el uso como una parte de un conjugado terapéutico, pero aún en combinación operable con la presente invención.

Cuando se usa uno o más agentes en combinación con la terapia de anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, no hay requisito de que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando

se lleva a cabo de manera separada cada tratamiento. Aunque en general son deseables al menos efectos aditivos, sería de beneficio cualquier efecto anti-tumoral incrementado por arriba de una de las terapias individuales. También, no hay requisito particular de que el tratamiento combinado exhiba efecto sinérgico, aunque esto es ciertamente posible y ventajoso.

Para practicar la terapia anti-angiogénica combinada, por ejemplo, para tratar un trastorno o enfermedad ocular u otro angiogénico, simplemente se administrará a un animal un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, en combinación con otro agente terapéutico, incluyendo otro agente anti-angiogénico (segundo) de una manera efectiva para dar por resultado sus acciones terapéuticas o anti-angiogénicas combinadas dentro del animal. Los agentes por lo tanto se proporcionarán en cantidades efectivas y durante periodos de tiempo efectivos para dar por resultado su presencia combinada dentro del sitio de enfermedad y sus acciones combinadas en el ambiente de enfermedad, tal como el ojo.

Para lograr este objetivo, el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 y otros agentes terapéuticos o anti-angiogénicos se pueden administrar al animal simultáneamente, ya sea en una composición individual o como dos composiciones distintas usando diferentes rutas de administración. De manera alteARNtiva, el tratamiento con anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 puede preceder, o seguir, el otro tratamiento terapéutico o anti-angiogénico por intervalos, por ejemplo

que varían desde minutos a semanas y meses. Se realizará este tratamiento de modo que el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 y otros agentes terapéuticos o anti-angiogénicos ejerzan un efecto terapéutico ventajosamente combinado.

Con respecto a la terapia tumoral, para practicar la terapia anti-tumoral combinada, se administrará igualmente a un animal un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 en combinación con otro agente anti-cáncer de una manera efectiva para dar por resultado sus acciones anti-tumorales combinadas dentro del animal. Los agentes nuevamente se proporcionarán en cantidades efectivas y durante periodos de tiempo efectivos para dar por resultado su presencia combinada dentro de la vasculatura tumoral y sus acciones combinadas en el ambiente tumoral.

El anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 y agentes anti-cáncer se pueden administrar a un animal de manera simultánea, ya sea en una composición individual, o como dos composiciones distintas usando diferentes rutas de administración. De manera alteARNtiva, el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, se puede dar antes, o después, del agente anti-cáncer, por ejemplo, de minutos a semanas y meses de separación. El agente anti-cáncer y el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, ejercerán un efecto ventajosamente combinado en el tumor. Muchos agentes anti-cáncer se darán antes de la terapia anti-angiogénica con anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2. Sin embargo, muchos otros

agentes anti-cáncer se administrarán de manera simultánea con el anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o subsiguientemente a esto, particularmente cuando se usa después de los inmunoconjugados humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2.

El uso general de combinaciones de sustancias en el tratamiento de cáncer es bien conocido. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos número 5,710,134 (incorporada en la presente como referencia) describe componentes que inducen necrosis en tumores en combinación con sustancias o "profármacos" no tóxicos. Las enzimas colocadas libres por procesos necróticos escinde el "profármaco" no toxico en el "fármaco" tóxico, que conduce a muerte de células tumorales. También, la patente de los Estados Unidos número 5,747,469 (incorporada en la presente como referencia) describe el uso combinada de vectores virales que codifican para p53 y agentes de daño al ADN. Se puede usar cualquiera de estos planeamientos similares con la presente invención.

En algunas situaciones, puede aún ser deseable prolongar el periodo de tiempo de tratamiento de manera significativa, donde transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7), o varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o aún varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas. Estos será ventajoso en circunstancias donde se propone un tratamiento para destruir sustancialmente el tumor, tal como cirugía o quimioterapia, y se propone otro tratamiento para impedir la micrometástasis o re-crecimiento tumoral, tal como

terapia basada en anti-angiogénicos. Los anti-angiogénicos se deben administrar en un tiempo cuidadoso después de la cirugía para permitir curación efectiva de heridas.

También se contempla que se utilizará más de una administración ya sea del anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, o el agente anti-cáncer. Los agentes se pueden administrar de manera indistinta, en días o semanas alteARNdas; o una secuencia de tratamiento con anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2, se puede dar, seguido por una secuencia de terapia de agente anti-cáncer. En cualquier caso, para lograr la regresión tumoral usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es distribuir ambos agentes en una cantidad combinada efectiva para ejercer un efecto anti-tumoral, a pesar de los momentos para la administración.

En términos de cirugía, se puede practicar cualquier intervención quirúrgica en combinación con la presente invención. En unión con radioterapia, se contempla cualquier mecanismo para inducir daño de ADN localmente dentro de las células tumorales, tal como γ-irradiación, rayos X, irradiación por UV, microondas y aún emisiones electrónicas y similares. La distribución directa de radioisótopos a células tumorales también se contempla, y esto se puede usar en unión con un objetivo de selección de objetivo u otros medios de selección de objetivo, y preferentemente, los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2.

La terapia de citocinas también ha probado ser un compañero efectivo para regímenes terapéuticos combinados.

Se pueden emplear varias citocinas en estos planteamientos combinados. Los ejemplos de citocinas incluyen IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNFα, TNFβ, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-β, IFN-γ. Las citocinas se administran de acuerdo a regímenes normales, consistente con indicaciones clínicas tal como la condición del paciente y toxicidad relativa de la citocina. También se pueden usar uteroglobinas para impedir o inhibir la metástasis (patente de los Estados Unidos número 5,696,092; incorporada en la presente como referencia).

G1. Quimioterapias

En ciertas modalidades, los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención se pueden administrar en combinación con un agente quimioterapéutico. Se puede usar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado descritos en la presente. Los agentes quimioterapéuticos contemplados como ejemplo incluyen, por ejemplo, adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorrubicina, tamoxifeno, taxol, taxotero, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), citosina-arabinósido, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatina (CDDP), aminopterina, combretastatinas y derivados y profármacos de los mismos.

Como se entenderá por los expertos en la técnica,

las dosis apropiadas de los agentes quimioterapéuticos en general serán alrededor de aquellas ya empleadas en terapias clínicas en donde los productos quimioterapéuticos se administren solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. A manera sólo de ejemplo, se pueden usar agentes tal como cisplatina, y otros de alquilación de ADN. Se ha usado ampliamente para tratar cáncer la cisplatina, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 $mg/m^2$ durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres transcursos. La cisplatina no se absorbe de manera oral y por lo tanto se debe distribuir mediante inyección de manera intravenosa, subcutáneamente, intratumoralmente o intraperitonealmente.

Los agentes útiles adicionales incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, mitosis y segregación cromosómica. Estos compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocida como doxorrubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina y similares. Ampliamente usados en un escenario clínico para el tratamiento de neoplasmas, estos compuestos se administran a través de inyecciones de bolo intravenosamente a dosis que varían desde 25-75 $mg/m^2$ a intervalos de 21 días para adriamicina, a 35-50 $mg/m^2$ para etopósido intravenosamente o doble dosis intravenosa de manera oral.

Los agentes que interrumpen la síntesis y fidelidad de los precursores de polinucleótido también se pueden usar. Particularmente útiles son los agentes que han sido sometidos a prueba extensa y están fácilmente

disponibles. Como tales, se usan preferentemente agentes tal como 5-fluorouracilo (5-FU) para tejido neoplástico, haciendo de éste agente particularmente útil para seleccionar como objetivo células neoplásticas. Aunque bastante tóxico, 5-FU, es aplicable en una amplia variedad de portadores, incluyendo administración tópica, sin embargo, se usa comúnmente administración intravenosa con dosis que varían desde 3 a 15 mg/kg/día.

Los agentes quimioterapéuticos de ejemplo para terapia combinada se listan en la Tabla C. Cada uno de los agentes listados son de ejemplo y no limitantes. El experto se dirige a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ava edición, capítulo 33, en páginas particulares 624-652. Se presentará probablemente variación en la dosis dependiendo de la condición que se trate. El facultativo que administre el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Tabla C

Agentes quimioterapéuticos útiles en enfermedad neoplástica

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| Agentes de alquilación | Mostazas de nitrógeno | Mecloretamina (clormetina, mustina, mostaza de nitrógeno, $HN_2$) Mustargen$^{MR}$ | Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | | Ciclofosfamida (citofosfano) Cytoxan[MR], Neosar[MR], Revimmune[MR] | Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, ovario, pulmón, tumor de Wilms, cuello uterino, testículos, sarcomas de tejido blando |
| | | Ifosfamida Mitoxana[MR], Ifex[MR] | Linfomas no Hodgkinianos, sarcoma de tejido blando, sarcoma osteogénico, testicular, mama, pulmonar, cervical, ovárico, óseo |
| | | Melfalano (L-sarcolisina) Alkeran[MR] | Mieloma múltiple, mama, ovario, melanoma |
| | | Clorambucilo Leukeran[MR] | Leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia primaria, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, ovario |
| | Etileniminas y metilmelaminas | Hexametilmelamina (Altretamina, HMM) Hexalen[MR] | Ovario |
| | | TioTEPA | Vejiga, mama, ovario |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | Alquil-sulfonatos | Busulfano<br>Myleran[MR], Busulfex[MR] | Leucemia granulocítica crónica |
| | Nitrosoureas | Carmustina<br>BiCNU[MR] | Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, tumores cerebrales primarios, mieloma múltiple, melanoma maligno, glioma, glioblastoma multiforme, meduloblastoma, astrocitoma |
| | | Lomustina (CCNU)<br>CeeNU[MR] | Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, tumores cerebrales primarios, pulmonar de células pequeñas |
| | | Semustina<br>(metil-CCNU) | Tumores cerebrales primarios, estómago, colon |
| | | Estreptozocina<br>(estreptozotocina)<br>Zanosar[MR] | Insulinoma pancreático maligno, carcinoide maligno |
| | Triazinas | Dacarbazina<br>(dimetiltriazenoimida, zolecarboxamida, imidazol-carboxamida)<br>DTIC[MR], DTIC-Dome[MR] | Melanoma maligno, enfermedad de Hodgkin, sarcomas de tejido blando, insulinoma pancreático maligno |
| | | Temozolomida<br>Temodar[MR], Temodal[MR] | Astrocitoma |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | Derivados de metil-hidrazina | Procarbazina (N-metilhidrazina, MIH) Matulane®, Natulan®, Indicarb® | Enfermedad de Hodgkin, glioblastoma multiforme |
| Anti-metabolitos | Análogos de ácido fólico, antimetabolitos de foliato | Metotrexato (ametopterina) | Leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, micosis fungoides, mama, cabeza y cuello, pulmón, sarcoma osteogénico, glioblastoma |
| | | Aminopterina | Leucemia |
| | | Pemetrexed Alimta® | Mesotelioma pleural, cáncer pulmonar de células no pequeñas, esofágico |
| | | Raltitrexed Tomudex® | Colorrectal |
| | Análogos de pirimidina | Fluorouracilo (5-fluorouracilo, 5-FU, fluouracilo, fluorodesoxiuridina) Efudex®, Carac®, Fluoroplex® Floxuridina (profármaco) FUDR® | Mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello, vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas (tópica) |
| | | Citarabina (citosina-arabinósido, ara C) Cytosar-U®, Tarabine PFS®, Depocyt® Capecitabina (profármaco) Xeloda® | Leucemias linfocíticas agudas y granulocíticas agudas, linfoma no Hodgkiniano |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | | Gemcitabina<br>Gemzar[MR] | Cánceres pancreático, de vejiga, mama, esofágico y pulmonar de células no pequeñas, linfomas |
| | Análogos de purina e inhibidores relacionados | Tioguanina (tioguanina, 6-tioguanina; TG) | Leucemias granulocíticas agudas, linfocíticas agudas, granulocíticas crónicas y mieloides crónicas |
| | | Pentostatina<br>(2-desoxicoformicina) | Leucemia de células pilosas, micosis fungoides, leucemia linfocítica crónica |
| | | Mercaptopurina<br>(6-mercaptopurina, 6-MP)<br>Purinethol[MR] | Leucemias linfocítica aguda, granulocítica aguda y granulocítica crónica, linfoma no Hodgkiniano |
| | | Cladribina (2CDA)<br>Leustatin[MR] | Leucemia de células pilosas, leucemia de células B, linfomas |
| | | Clofarabina<br>Clolar[MR], Evoltra[MR] | Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica juvenil |
| | | Fludarabina<br>(fludarabina-fosfato)<br>Fludara[MR] | Malignidades hematológicas |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | Alcaloides de vincapervinca | Vinblastina (VLB) | Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, cáncer de mama, testículo, pulmonar de células no pequeñas |
| | | Vincristina Oncovin[MR] | Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms (nefroblastoma), rabdomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, de pulmón de células pequeñas |
| | | Vindescina Eldisine[MR] | Leucemia, linfoma, melanoma, mama, pulmón |
| | | Vinorelbina Navelbine[MR] | Mama, pulmón de células no pequeñas |
| | Podofilotoxinas Epipodo-filotoxinas | Etopósido (etopósido-fosfato) Eposin[MR], Etopophos[MR], Vepesid[MR], VP-16[MR] | Testículos, de pulmón de células pequeñas y otras de pulmón, mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, leucemia granulocítica aguda, sarcoma de Kaposi, glioblastoma multiforme |
| | | Tenipósido Vumon[MR], VM-26[MR] | Leucemia linfocítica aguda |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| Productos naturales | Antibióticos de antraciclina (antraciclinas) | Daunorrubicina (daunomicina, rubidomicina) Cerubidine[MR] | Leucemias granulocítica aguda y linfocítica aguda, neuroblastoma |
| | | Doxorrubicina (hidroxi-daunorrubicina, adriamicina) Rubex[MR], Doxil[MR] | Sarcomas de tejido blando, osteogénicos y otros; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, leucemias agudas; mama, genitourinario, tiroides, pulmón, estómago, ovario, tiroides, vejiga, neuroblastoma, mieloma múltiple |
| | | Epirubicina Ellence[MR], Pharmorubicin[MR], Ebewe[MR] | Mama, ovárico, gástrico, pulmonar; linfomas |
| | | Idarrubicina (4-desmetoxi-daunorrubicina) Zavedos[MR], Idamycin[MR] | Leucemia mieloide aguda |
| | | Valrubicina (N-trifluoro-acetil-adriamicin-14-valerato) Valstar[MR] | Vejiga |
| | Antracenodiona | Mitoxantrona | Leucemia granulocítica aguda, mama, linfoma no Hodgkiniano |
| | | Pixantrona | Mama, linfoma no Hodgkiniano |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | Antibióticos de polipéptido y péptido | Bleomicina<br>Blenoxane[MR] | Testículos, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y tracto genitourinario; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkinianos, carcinomas de células escamosas |
| | | Actinomicina-D<br>Dactinomycin[MR] | Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, testículos, sarcoma de Kaposi |
| | | Plicamicina (mitramicina)<br>Mithracin[MR] | Testículos, hipercalcemia maligno |
| | | Mitomicina<br>(mitomicina C) | Estómago, cuello uterino, colon, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello, esofágico |
| | Enzimas | L-Asparaginasa<br>Elspar[MR] | Leucemia linfocítica aguda, tumores de células cebadas |
| | Modificadores de respuesta biológica | Interferón-alfa<br>(IFNα)<br>Interferones pegilados<br>Multiferon[MR],<br>Roferon[MR], Pegasys[MR],<br>IntronA[MR], PegIntron[MR] | Leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, célula renal, ovárico, vejiga, linfomas no Hodgkinianos, micosis fungoide, mieloma múltiple, leucemia granulocítica crónica |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| Interruptores citoesqueléticos | Taxanos | Taxol (paclitaxel) Abraxane[MR] | Mama, ovario, pulmón, cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi |
| | | Docetaxel Taxotere[MR] | Mama, ovario, pulmón, colorrectal, ovario, gástrico, renal, próstata, hígado, cabeza y cuello, melanoma |
| | Combretastatinas | Combretastatina A-4 CA-4-P | Tiroides |
| | Complejos de coordinación de platino | Cisplatina (*cis*-DDP, cisplatino) | Testículo, ovario, vejiga, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cuello uterino, endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico, linfoma |
| | | Carboplatina Paraplatin[MR] | Ovario, pulmón, cabeza y cuello |
| | | Oxaliplatina Eloxatin[MR], Oxaliplatina Medac[MR] | Colorrectal |
| | Camptotecinas | Topotecano Hycamtin[MR] | Ovario, pulmón |
| | | Irinotecano (CPT-11) Camptosar | Colon |
| Otros agentes | Urea sustituida | Hidroxiurea (hidroxicarbamida) | Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombositosis esencial, melanoma maligno |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | Adrenocortical | Mitotano (*o,p'*-DDD) Lysodren[MR] | Corteza suprarrenal |
| | Supresor esteroide | Aminoglutetimida Cytadren[MR] | Mama |
| | Inhibidores de tirosina-cinasas | Axitinib | Mama, carcinoma de células renales, páncreas |
| | | Dasatinib (BMS-354825) Sprycel[MR] | Leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, melanoma metastático |
| | | Erlotinib (OSI-774) Tarceva[MR] | Cáncer pulmonar de células no pequeñas, pancreático |
| | | Gefitinib (ZD1839) Iressa[MR] | Cáncer pulmonar de células no pequeñas |
| | | Imatinib (CGP57148B o STI-57I) Gleevec[MR], Glivec[MR] | Leucemia mielógena crónica, gastrointestinal |
| | | Lapatinib (GW572016) Tykerb[MR], Tyverb[MR] | Mama |
| | | Sorafenib Nexavar[MR] | Carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular |
| | | Sunitinib (SU11248) Sutent[MR] | Carcinoma de células renales, gastrointestinal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mama |
| | Tirosina-cinasas de receptor | Cetuximab (anti-EGFR) Erbitux[MR] | Colorrectal, cabeza y cuello |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | | Panitumumab (anti-EGFR) Vectibix® | Colorrectal |
| | | Trastuzumab (anti-HER2/neu, receptor de erbB2) Herceptin® | Mama, cáncer de HER2/neu |
| | CD20 | Rituximab Rituxan®, MabThera®, Reditux® | Linfoma no Hodgkiniano, leucemia de células B |
| | | Tositumomab (anti-CD20-$^{131}$I) Bexxar® | Linfoma folicular, linfoma no Hodgkiniano |
| | | Alemtuzumab (anti-CD52) Campath® | Leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células T |
| | | Bevacizumab (anti-VEGF) Avastin® | Colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mama, carcinoma de células renales, glioblastoma multiforme, cáncer prostático refractario a hormonas, páncreas |
| | | Gemtuzumab (anti-CD33-calquimicina) Mylotarg® | Leucemia mielógena aguda |
| Hormonas y antagonistas | Adreno-corticosteroides | Prednisona | Leucemias linfocíticas agudas y crónicas, linfomas no Hodgkinianos, enfermedad de Hogdkin, mama, mieloma múltiple |

| Clase | Tipo de Agente | Ejemplos | Enfermedad |
|---|---|---|---|
| | Progestinas | Hidroxiprogesterona-caproato, Medroxiprogesterona-acetato Megestrol-acetato Megace[MR] | Endometrio, mama |
| | Estrógenos | Dietilestilbestrol Etinil-estradiol Estramustine[MR] (derivado de mecloretamina) | Mama, próstata |
| | Antiestrógenos | Tamoxifeno Nolvadex[MR], Istubal[MR], Valodex[MR] | Mama |
| | Andrógenos | Testosterona-propionato Fluoximesterona (Halotestina) | Mama |
| | Antiandrógenos | Flutamida (Flutamina) Eulexin[MR] | Próstata |
| | Análogo de hormona de liberación de gonadotropina | Leuprólido Lupron[MR], Lupron Depot[MR], Viadur[MR] Eligard[MR], Prostap[MR] | Próstata, mama |

G2. Anti-Angiogénicos

Bajo condiciones fisiológicas normales, los humanos o animales experimentan angiogénesis solo en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, probablemente se observa angiogénesis en curación de heridas, desarrollo fetal y embriónico y formación del cuerpo amarillo corpus luteum, endometrio y placenta. La angiogénesis descontrolada (persistente y/o desregulada) se relaciona a varios estados de enfermedad, y se presenta durante la metástasis tumoral.

Tanto la angiogénesis controlada como descontrolada se piensa que prosigue de una manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, circundados por una membrana de basal, forman vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis empieza con la erosión de la membrana de basal por enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que forran el lumen de los vasos sanguíneos, entonces sobresale a través de la membrana de basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana erosionada de basamento. Las células migradoras forman un "brote" fuera del vaso sanguíneo de origen, donde las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar asas capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

El presente anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 se puede usar en combinación con cualquiera o más de otras terapias anti-angiogénicas. Se incluyen combinaciones con otros agentes que inhiben VEGF, tal como otros anticuerpos neutralizantes (Kim et al, 1992; Presta et al, 1997; Sioussat et al, 1993; Kondo et al, 1993; Asano et al, 1995; Hurwitz et al, 2004), construcciones de receptores solubles (Kendall y Thomas, 1993; Aiello et al, 1995; Lin et al, 1998; Millauer et al, 1996), inhibidores de tirosina-cinasa (Siemeister et al, 1998), estrategias antisentido, aptámeros de ARN y robozimas contra VEGF o receptores de VEGF (Saleh et al, 1996; Cheng et al, 1996; cada una incorporado en la presente como referencia). También se pueden emplear

variantes de VEGF con propiedades antagonistas, como se describe en la WO 98/16551, incorporada específicamente en la presente como referencia.

Las terapias anti-angiogénicas se pueden basar en la provisión de un agente anti-angiogénico o en la inhibición de un agente angiogénico. Se puede lograr la inhibición de los agentes angiogénicos por uno o más de los métodos descritos para inhibir el VEGF, incluyendo anticuerpos neutralizantes, construcciones del receptor solubles, inhibidores de molécula pequeña, antisentido, aptámeros de ARN ribozimas se pueden emplear todos. Por ejemplo, se puede emplear anticuerpos a angiogénica, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,520,914, incorporada específicamente en la presente como referencia. Ya que FGF se conecta con la angiogénesis, también se puede usar inhibidores de FGF. Ciertos ejemplos son los compuestos que tienen N-acetilglucosamina alteARNnte en secuencia con ácido urónico 2-O-sulfatado como sus unidades principales de repetición, incluyendo glicosaminoglicanos, tal como sulfato de arcarano. Estos compuestos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6,028,061, incorporada específicamente en la presente como referencia, y se pueden usar en combinación con esta.

Ahora se conocen numerosos inhibidores de tirosina-cinasa útiles para el tratamiento de la angiogénesis, como se manifiesta en varios estados de enfermedad. Estos incluyen, por ejemplo, las 4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidinas de la Patente de los Estados Unidos No. 5,639,757, incorporada específicamente en la

presente como referencia, que también se puede usar en combinación con la presente invención. Los ejemplos adicionales de moléculas orgánicas capaces de modular la transducción de señales de tirosinas-cinasas mediante el receptor VEGFR2 son los compuestos de quinazolina y composiciones de la Patente de los Estados Unidos No. 5,792,771, que se incorpora específicamente en la presente como referencia para el propósito de describir adicionalmente combinaciones para el uso con la presente invención en el tratamiento de enfermedades angiogénicas.

También se ha demostrado que los compuestos de otras clases químicas inhiben la angiogénesis y se pueden usar en combinación con la presente invención. Por ejemplo, en terapia combinada se pueden emplear esteroides tal como los 4,9(11)-esteroides angioestáticos y los esteroides C21-oxigenados como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,972,922, incorporada específicamente en la presente como referencia. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,712,291 y 5,593,990, cada una incorporada específicamente en la presente como referencia, describen talidomida y compuestos relacionados, precursores, análogos, metabolitos y productos de hidrólisis, que se pueden usar también en combinación con la presente invención para inhibir la angiogénesis. Los compuestos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,712,291 y 5,593,990 se pueden administrar de manera oral. Los agentes anti-angiogénicos adicionales de ejemplo que son útiles en unión con la terapia combinada se listan en la Tabla D. Cada uno de los agentes listados en la presente son de

ejemplo y de ningún modo limitantes.

Tabla D

Inhibidores y Reguladores Negativos de la Angiogénesis

| Substancias | Referencias |
|---|---|
| VEGFR1 Soluble | Shibuya, 2006 |
| Neuropilin-1 Soluble (NRP-1) | Gagnon et al., 2000 |
| Angiostatina | O'Reilly et al., 1994 |
| Endostatina | O'Reilly et al., 1997 |
| Angiopoyetina 2 | Maisonpierre et al., 1997 |
| Calreticulina | Pike et al., 1999 |
| Vasostatina | Pike et al., 1998 |
| Vasculostatina | Kaur et al., 2005 |
| Canstatina | Kamphaus et al., 2000 |
| Maspina | Zou et al., 1994 |
| Fragmento de prolactina de 16kDa | Ferrara et al., 1991; Clapp et al., 1993; D'Angelo et al., 1995; Lee et al.,1998 |
| Péptidos de laminina | Kleinman et al., 1993; Yamamura et al., 1993; Iwamoto et al., 1996; Tryggvason, 1993 |
| Péptidos de fibronectina | Grant et al., 1998; Sheu et al., 1997 |
| Inhibidores de metaloproteinasa de tejido (TIMP 1, 2, 3, 4) | Sang, 1998 |
| Inhibidores de activador de plasminógeno (PAI-1, -2) | Soff et al., 1995 |
| Factor α de necrosis tumural (alta dosis, *in vitro*) | Frater-Schroder et al., 1987 |
| TGF-β1 | RayChadhury y D'Amore, 1991; Tada et al., 1994 |
| Interferones(IFN-α, -β, -γ) | Moore et al., 1998; Lingen et al., 1998 |

| Substancias | Referencias |
|---|---|
| Quimiocinas ELR-CXC:IL-12; IL-4; IL-18; SDF-1; MIG; factor 4 de plaquetas (PF4); IP-;10 CXCL10 | Moore et al., 1998; Hiscox y Jiang, 1997; Coughlin et al., 1998; Tanaka et al., 1997 |
| Trombospondina (TSP), TSP-1 y TSP-2 | Good et al., 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma et al., 1993; Sheibani y Frazier, 1995; VolpertetaL, 1998 |
| SPARC | Hasselaar y Sage, 1992; Lane et al., 1992; Jendraschak y Sage, 1996 |
| 2-Metoxioestradiol | Fotsis et al., 1994 |
| Proteína relacionada proliferina | Jackson et al., 1994 |
| Suramina | Gagliardi et al., 1992; Takano et al., 1994; Waltenberger et al., 1996; Gagliardi et al., 1998; Manetti et al., 1998 |
| Talidomida | D'Amato et al., 1994; Kenyon et al., 1997 Wells, 1998 |
| Carboxiamidotriazol (CAI) | Hussain et al., 2003 |
| Cortisona | Thorpe et al., 1993 Folkman et al., 1983 Sakamoto et al., 1986 |
| Linomida | Vukanovic et al., 1993; Ziche et al., 1998; Nagler et al., 1998 |
| Fumagilina (AGM-1470; TNP-470) | Sipos el al., 1994; Yoshida et al., 1998 |
| Tamoxifeno | Gagliardi and Collins, 1993; Lindner y Borden, 1997; Haran et al., 1994 |
| Extracto de muerdano Koreano (*Viscum album coloratum*) | Yoon et al., 1995 |
| Retinoides | Oikawa et al., 1989; Lingen et al., 1996; Majewski et al. 1996 |

| Substancias | Referencias |
|---|---|
| CM101 | Hellerqvist et al., 1993; Quinn et al., 1995; Wamil et al., 1997; DeVore et al., 1997 |
| Dexametasona | Hori et al., 1996; Wolff et al., 1997 |
| Factor inhibidor de Leucemia (LIF) | Pepper et al., 1995 |

Ciertos componentes preferidos para el uso en la inhibición de la angiogénesis son angiostatina, endostatina, vasculostatina, canstatina y maspina. Estos agentes se describen anteriormente en unión con los inmunoconjugados de la presente invención, pero se pueden usar en forma combinadas, pero no conjugada.

Se ha mostrado ya que ciertas terapias anti-angiogénicas provocan regresiones tumorales, incluyendo el polisacárido bacteriano CM101 y el anticuerpo LM609. El CM101 es un polisacárido bacteriano que se ha caracterizado bien en su capacidad para inducir inflamación neovascular en tumores. El CM101 se une a y retícula los, receptores expresados en endotelio desdiferenciado que estimula la activación del sistema de complemento. También inicia una respuesta inflamatoria activada por citocinas que selecciona selectivamente con un objetivo el tumor. Es un agente antipatoangiogénico de manera única que reduce la expresión de VEGF y sus receptores. Actualmente el CM101 está en ensayos clínicos como un fármaco anti-cáncer, y se puede usar en combinación con la presente.

La trombospondina (TSP-1) y el factor 4 de plaquetas (PF4) también se pueden usar en combinación con

la presente invención. Estos son inhibidores de angiogénesis que se asocian con heparina y se encuentran en los α-gránulos de las plaquetas. La TSP-1 es una glicoproteína multidominio grande de 450kDa que es constituyente de la matriz extracelular. La TSP-1 se une a muchas de las moléculas de proteoglicano encontradas en la matriz extracelular incluyendo, HSPG, fibronectina, laminina, y diferentes tipos de colágeno. La TSP-1 inhibe la migración y proliferación de células endoteliales, *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. La TSP-1 también puede suprimir el fenotipo maligno y la tumorigénesis de células endoteliales transformadas. Se ha mostrado que el gen supresor tumoral p53 favorece directamente la expresión de TSP-1 tal que, la pérdida de la actividad de p53 provoca una reducción drámatica en la producción de TSP-1 y un incremento concomitante en la angiogénesis iniciada en tumor.

El PF4 es una proteína de 70aa que es miembro de la familia de CXC-ELR de quimiocinas que es capaz de inhibir de manera potente la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. El PF4 administrado de la manera intratumoral o distribuido por un vector adenoviral es capaz de provocar una inhibición del crecimiento tumoral.

Los interferones y los inhibidores de metaloproteinasa son otras dos clases de inhibidores angiogénicos que se presentan de manera natural que se pueden combinar con la presente invención. La actividad-endotelial de los interferones se ha mostrado desde

comienzo de 1980, sin embargo, aún no es claro el mecanismo de inhibición. Se conoce que puede inhibir la migración de células endoteliales y que tiene alguna actividad anti-angiogénica *in vivo* que posiblemente se media por la capacidad para inhibir la producción de promotores angiogénicos por células tumorales. Los tumores vasculares en particular son sensibles a interferón, por ejemplo, los emangiomas proliferantes se pueden tratar de manera exitosa con IFNα.

Los inhibidores en tejido de metaloproteinasas (TIMP) son una familia de inhibidores que se presentan de manera natural de metaloproteasas de matriz (MMP) que también pueden inhibir la angiogénesis y se pueden usar en protocolos de tratamiento combinado. Las MMP juegan un papel importante en el proceso angiogénico puesto que degradan la matriz a través de la cual migran las células endoteliales y los fibroblastos cuando se extienden o remodelan la red vascular. En realidad, se ha mostrado que un miembro de las MMP, la MMP-2, se asocia con endotelio activado a través de la integrina αvβ3 presuntamente para este propósito. Si esta interacción se interrumpe por un fragmento de MMP-2, entonces la angiogénesis se reduce en expresión y se inhibe el crecimiento de tumores.

Hay varios agentes farmacológicos que inhiben la angiogénesis, cualquiera o más de los cuales se puede usar en combinación con la presente invención. Estos incluyen AGM-1470/TNP-470, talidomida, y carboxiamidotriazol (CAI). Se encuentra que fumagilina es un potente inhibidor de la angiogénesis en 1990, y desde entonces se han desarrollado

análogos sintéticos de fumagilina, AGM-1470 y TNP-470. Ambos de estos fármacos inhiben la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. Se ha estudiado TNP-470 de manera extensa en ensayos clínicos humanos con datos que sugieren que es óptima la administración a largo plazo.

Originalmente se usó la talidomida como un sedante pero se encontró que es un potente teratógeno y se descontinuó. En 1994 se encontró que la talidomida se un inhibidor de la angiogénesis. Actualmente la talidomida está en ensayos clínicos como un agente anti-cáncer así como un tratamiento de enfermedades oculares vasculares.

El CAI es un inhibidor sintético de pequeño peso molecular de la angiogénesis que actúa como un bloqueador del canal de calcio que impide la reorganización de la actina, la migración de células endoteliales y la propagación y la extensión a colágeno IV. El CAI inhibe la neovasculización a concentraciones fisiológicas logrables y es bien tolerado oralmente por pacientes con cáncer. Los ensayos clínicos con CAI han producido estabilización de la enfermedad en 49 % de los pacientes con cáncer que tienen enfermedad progresiva antes del tratamiento.

Se mostró que la cortisona en la presencia de heparina o fragmentos de heparina inhibe el crecimiento tumoral en ratones al bloquear la proliferación de células endoteliales. El mecanismo ha comprendido en el efecto inhibidor aditivo del esteroide y heparina no es claro aunque se piensa que la heparina puede incrementar la captación del esteroide por células endoteliales. Se ha

mostrado que la mezcla incrementa la disolución de la membrana basal por debajo de los capilares recién formados y esto también es una posible explicación para el efecto angioestático aditivo. Los conjugados de heparina-cortisol tienen potentes efectos angiostáticos y anti-tumorales *in vivo*.

Los inhibidores específicos adicionales de la angiogénesis que incluyen, pero no se limitan a, Factor Anti-Invasivo, ácidos retinoicos y paclitaxel (Patente de los Estados Unidos No. 5,716,981; incorporada en la presente como referencia); AGM-1470 (Ingber et al, 1990; incorporada en la presente como referencia); extracto de cartílago de tiburón (Patente de los Estados Unidos No. 5,618,925; incorporada en la presente como referencia); oligómeros aniónicos de poliamida o poliurea (Patente de los Estados Unidos No. 5,593,664; incorporada en la presente como referencia); derivados de oxindol (Patente de los Estados Unidos No. 5,576,330; incorporada en la presente como referencia); derivados de estradiol (Patente de los Estados Unidos No. 5,504,074; incorporada en la presente como referencia); y derivados de tiazolopirimidina (Patente de los Estados Unidos No. 5,599,813; incorporada en la presente como referencia) también se contempla para el uso, composiciones anti-angiogénicas para los usos combinados de la presente invención.

También se pueden usar composiciones que comprenden un antagonista de una $\alpha_v\beta_3$ integrina para inhibir la angiogénesis en combinación con la presente invención. Como se describe Patente de los Estados Unidos No.

5,766,591 (incorporada en la presente como referencia), los polipéptidos que contienen RGD y sales de los mismos, incluyendo polipéptidos cíclicos, son ejemplos adecuados de antagonistas de alfa $\alpha_v\beta_3$-integrina.

El anticuerpo LM609 contra la $\alpha_v\beta_3$ integrina también induce regresiones tumorales. Los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ integrina tal como LM609, inducen apoptosis de células endoteliales angiogénicas que conducen a vasos sanguíneos inactivos sin afectar. El LM609 u otros antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ también pueden trabajar al inhibir la interacción de $\alpha_v\beta_3$ y MMP-2, una enzima proteolítica que se piensa que juega un papel importante en la migración de células endoteliales y fibroblastos. La Patente de los Estados Unidos No. 5,753,230 se incorpora específicamente en la presente por referencia para describir anticuerpos contra $\alpha_v\beta_3$ (vitronectina $\alpha_v\beta_3$) para combinación con la presente invención para inhibir la angiogénesis.

La apoptosis del endotelio angiogénico en este caso puede tener un efecto tipo cascada en la detección de la red vascular. La inhibición de la red vascular tumoral de que responda completamente a la señal de tumor para expanderse puede iniciar, en realidad, el colapso parcial o completo de la red que da por resultado la muerte de células tumorales y la pérdida del volumen tumoral. Es posible que la endostatina y la angiostatina funcionen de una manera similar. El hecho que LM609 no afecte vasos inactivos sino sea capaz de provocar regresiones tumorales sugiere fuertemente que no todos los vasos sanguíneos en un tumor necesitan ser seleccionados como objetivo para el

tratamiento a fin de obtener un efecto anti-tumoral.

También se pueden usar otros métodos de intervención terapéutica basados en la alteración de la señalización a través del receptor Tie2 en combinación con la presente invención, tal como el uso del receptor Tie2 soluble capaz de bloquear la activación de Tie2 (Lin et al, 1998). Se ha mostrado que la distribución de esta construcción que usa terapia génica adenoviral recombinante es efectiva en el tratamiento de cáncer y en la reducción de metástasis (Lin et al, 1998).

G3. Agentes Inductores de Apoptosis

También se pueden combinar de manera ventajosa los agentes terapéuticos de anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 con los métodos para inducir apoptosis. Se han descrito varios agentes inductores de apoptosis en lo anterior en unión con los inmunoconjugados de la presente invención. Se puede usar cualquier agente inductor de apoptosis en combinación con la presente invención sin que se enlace a un anticuerpo de la invención.

Además de los agentes inductores de apoptosis descritos anteriormente como inmunoconjugados, se han identificado varios oncogenes que inhiben la apoptosis, o muerte celular programada.

Los oncogenes de ejemplo en esta categoría incluyen, pero no se limitan a, bcr-abl, bcl-2 (distinto de bcl-1, ciclina D1; números de acceso al GenBank M14745, X06487; Patente de los Estados Unidos Nos. 5,650,491; y 5,539,094; cada una incorporada en la presente como

referencia) y miembros de la familia que incluyen Bc1-x1, Mc1, Bak, A1, A20. Primero se descubrió la sobreexpresión de bc1-2 en linfoma de células T. El bcl-2 funciona como un oncogén por la unión e inactivación de Bax, una proteína en la ruta apoptótica. La inhibición de la función de bcl-2 impide la inactivación de Bax, y permite que prosiga la ruta apoptótica.

La inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, usando secuencias de nucleótidos antisentido, se contempla para uso en la presente invención para dar mejora de la apoptosis (Patente de los Estados Unidos No. 5,650,491; 5,539,094; y 5,583,034; cada una incorporada en la presente como referencia).

G4. Inmunotoxinas y Coaguligandos

Los métodos de tratamiento de la invención se pueden usar en combinación con inmunotoxinas y/o coaguligandos en los cuales la porción de selección de objetivo de los mismos por ejemplo, anticuerpo ligando, se dirige a un marcador relativamente específico de las células tumorales, vasculatura tumoral o estroma tumoral. En común con los agentes quimioterapéuticos y anti-angiogénicos analizados anteriormente, el uso combinado de toxinas o coagulantes dirigidos al objetivo dará por resultado en general resultados anti-tumorales aditivos, marcadamente mayores que los aditivos o aún sinérgicos.

Hablando en general, los anticuerpos o ligandos para el uso en estos aspectos adicionales de la invención reconocerán de manera preferente antígenos tumorales

accesibles que preferentemente o específicamente se expresan en el sitio tumoral. Los anticuerpos o ligandos también exhibirán preferentemente propiedades de alta afinidad; y los anticuerpos, ligandos y conjugados de los mismos, no ejercerán efectos secundarios significativos *in vivo contra tejidos normales que sostienen la vida*, tal como uno o más tejidos seleccionados de corazón, riñón, cerebro, hígado, médula ósea, colón, mama, próstata, tiroides, vejiga biliar, pulmón, glándulas suprarenales, músculo, fibras nerviosas, páncreas, piel, u otro órgano tejido sustentador de visa en el cuerpo humano. El término "efecto secundario significativo" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo, ligando o conjugado de anticuerpo, que cuando se administra *in vivo*, producirá solo efecto secundarios insignificantes o clínicamente manejables tal como aquellos normalmente encontrados durante la quimioterapia.

Al menos una región de unión de estos segundos agentes anti-cáncer empleados en combinación con la invención será un componente que sea capaz de distribuir una toxina o factor de coagulación a la región tumoral, es decir capaz de colocarse dentro de un sitio tumoral. Estos agentes de selección de objetivo se pueden dirigir contra un componente de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral. Los agentes de selección de objetivo se unirán en general a un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie de una célula tumoral, vasculatura tumoral o estroma tumoral. Sin embargo, una vez que empieza la destrucción de la

vasculatura tumoral y las células tumorales, se liberarán componentes internos, permitiendo la selección adicional como objetivo de virtualmente cualquier componente tumoral.

Se han descrito muchos antígenos de células tumorales, cualquiera de los cuales se puede emplear como un objetivo en unión con los aspectos combinados de la presente invención. Los antígenos apropiados de células tumorales para selección adicional de objetivos de inmunotoxinas y coaguligandos incluyen aquellos reconocidos por los anticuerpos B3 (Patente de los Estados Unidos No. 5,242,813); incorporada en la presente como referencia; ATCC HB 10573); KSI/4 (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,369); incorporada en la presente como referencia; obtenido de una célula que comprende los vectores NRRL B-18356 y/o NRRL B-18357); 260F9 (ATCC HB 8488); y D612 (Patente de los Estados Unidos No. 5,183,756); incorporada en la presente como referencia; ATCC HB 9796). También se puede consultar el catálogo de ATCC de cualquier año subsiguiente para identificar otras líneas celulares apropiadas que produzcan anticuerpos anti-células tumorales.

Para la selección de objetivo de la vasculatura tumoral, el anticuerpo o ligando de selección de objetivo frecuentemente se unirá a un marcador expresado por, adsorbido a, inducido en o de otro modo colocado en los vasos sanguíneos intratumorales de un tumor vascularizado. Las moléculas objetivo expresadas apropiadas incluyen, por ejemplo, endoglina, E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PSMA (Liu et al, 1997), un TIE, un ligando reactivo con

LAM-1, un receptor de VEGF/VPF, un receptor de FGF, $\alpha_v\beta_3$ integrina, pleyotropina y endosialina. Los objetivos adsorbidos adecuados son aquellos tal como VEGF, FGF, TGFβ, HGF, PF4, PDGF, TIMP, un ligando que se une a TIE e isoformas de fibronectina asociadas a tumor. Los antígeno inducibles de manera natural y artificial por citocinas y coaguligandos también se puede seleccionar como objetivos tal como ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, un ligando reactivo con LAM-1, endoglina, y aún MHC Clase II (inducible por citocinas, por ejemplo, por IL-1, TNF-α, IFN-γ, IL-4 y/o TNF-β); y E-selectina, P-selectina, PDGF e ICAM-1 (inducible por coagulante, por ejemplo, por trombina, Factor IX/IXa, Factor X/Xa y/o plasmina).

Las siguientes patentes se incorporan específicamente en la presente como referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de inmunotoxinas dirigidas contra marcadores expresados, adsorbidos, inducidos o localizados de la vasculatura tumoral: Patente de los Estados Unidos Nos. 6,093,399; 5,855,866; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555; 5,877,289; 6,004,554; 5,776,427; 5,863,538; 5,660,827 y 6,036,955.

Los métodos y composiciones adicionales de selección como objetivo de la vasculatura tumoral incluyen aquellos aminofosfolípidos de selección de objetivo, tal como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, recientemente descubiertas como que son marcadores específicos accesibles de los vasos sanguíneos tumorales. La administración de anticuerpos anti-aminofosfolípidos

solos es suficiente para inducir trombosis y regresión tumoral. La presente invención de esta manera se puede combinar de manera efectiva con anticuerpos no conjugados, anti-fosfatidilserina y/o fosfatidiletanolamina; o se pueden usar inmunoconjugados de estos anticuerpos.

Las siguientes patentes se incorporan específicamente en la presente como referencia para los propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de anticuerpos anti-aminofosfolípidos e inmunotoxinas: Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,406,693; 6,312,694; 6,783,760; 6,818,213; y 7,067,109. Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,312,694; 6,783,760; 6,818,213; y 7,067,109 se incorporan adicionalmente en la presente como referencia para los propósitos de complementar adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto al uso de conjugados de proteína de unión a aminofosfolípidos, tal como conjugados de anexina, para el uso en la distribución de toxinas y coagulantes a vasos sanguíneos tumorales y para inducir trombosis y regresión tumoral.

Los objetivos estromales tumorales adecuados incluyen componentes de la matriz extracelular o estroma tumoral, o componentes unidos en los mismos; incluyendo marcadores de membrana basal, colágeno tipo IV, laminina, sulfato de parano, proteoglicano, fibronectinas, plaquetas activadas, LIBS y tenascina. Un objetivo preferido para estos usos es REBS.

Las siguientes patentes incorporan específicamente la presente como referencia para los

propósitos de complementar aún adicionalmente las presentes enseñanzas con respecto a la preparación y uso de agentes de selección de objetivos estromales tumorales: Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,093,399; 6,004,555; 5,877,289; y 6,036,955.

Los segundos productos terapéuticos anti-cáncer se pueden unir de manera operativa a cualquiera de los agentes citotóxicos o de otro modo anti-celulares descritos en la presente para el uso en el anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o las inmunotoxinas basadas en los anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2. Sin embargo, los agentes anti-celulares adecuado también incluyen radioisotopos. Se preferirán las porciones de toxina, tal como cadena de ricina A y cadena A desglicosilada (dgA).

El segundo agente seleccionado como objetivo para uso opcional con la invención puede comprender un componente seleccionado como objetivo que sea capaz de promover la coagulación, es decir, un coaguligando. Aquí, el anticuerpo o ligando de selección de objetivo se puede enlazar directa o indirectamente, por ejemplo mediante otro anticuerpo, a cualquier factor que estimule directa o indirectamente la coagulación, incluyendo cualquiera de aquellos descritos en la presente para el uso en el anticuerpo anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 o coaguligandos basados en anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2. Los factores de coagulación preferidos para estos usos son factor de tejido (TF) y derivados de TF, tal como TF truncado (tTF), TF dimérico y multimérico, y TF mutante deficiente en la capacidad para activar el Factor VII.

Las dosis efectivas de las inmunotoxinas y coaguligandos para uso combinado en el tratamiento de cáncer estarán entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg, y de manera preferente, entre aproximadamente 0.8 mg/kg y aproximadamente 1.2 mg/kg, cuando se administran mediante la ruta IV a una frecuencia de aproximadamente 1 vez por semana. Alguna variación en la dosis se presentará necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que se trate. El facultativo responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

G5. Agonistas de TLR

Ahora se ha establecido que la señalización mediante receptores tipo cuota (TLR) contribuye a los efectos de agentes anti-cáncer conocidos, incluyendo *S. choleraesuis* atenuado, BCG y taxol, cada uno que activa TLR4. En realidad, la señalización de TLR4 contribuye a los efectos anti-cáncer de quimioterapia y radioterapia (Apetoh et al., 2007). Así como el mejor entendimiento de los mecanismos de acción de ciertos agentes anti-cáncer conocidos, el reconocimiento de la importancia de la señalización de TLR también ha promovido el desarrollo de nuevos productos terapéuticos de cáncer que funcionan al activar los TLR.

Por lo tanto, los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención se pueden usar en tratamiento de cáncer en combinación con uno o más agentes que estimulan la señalización mediante un TLR, es decir, con uno o más agonistas de TLR. Al menos un primer

agonista de TLR también se puede unir de manera operativa a un anticuerpo humano de la invención para crear un conjugado terapéutico, como se describe en la presente en la sección de inmunoconjugados. Se puede usar cualquiera o más de los siguientes u otros agonistas de TLR en los presentes tratamientos de combinación de cáncer.

Los agonistas de TLR adecuados incluyen agonistas de cualquiera o más de TLR1 a TLR11, preferentemente TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 o TLR9, y de manera más preferente TLR4, TLR7, TLR8 o TLR9. Los agonistas de TLR1/TLR2 incluyen lipoproteínas, por ejemplo, OspA, y lipopéptidos triacilados, y los agonistas de TLR2 incluyen lipoproteínas bacterianas, LAM, MALP-2, GPI, glicolípidos y porinas.

Los ejemplos particulares de los agonistas de TLR4 incluyen el anticuerpo anti-TLR4 agonístico nombrado 5D24.D4 (Cohen et al, 2003), LPS, lípido A y derivados de los mismos, de los cuales actualmente se prefieren monofosforil-lípido A (MPL) y análogos de MPL. Los análogos de MPL. Los análogos de MPL conocidos como AGP se pueden usar como agonistas sintéticos de TLR4 en combinación con la presente invención (Alderson et al., 2006). Los agonistas que estimulan la señalización mediante TLR4 y CD14 también incluyen LPS, lípido A, MPL y análogos de MPL, así como taxol, paclitaxel, flavolipina y GIPL. Los agonistas de TLR4 OK-432 y OK-PSA se han usado para tratar cáncer cervical y carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

Los agonistas de TLR7 incluyen imiquimod, resiquimod e isatoribina (Finberg et al., 2005; Horsmans et

al., 2005), el imiquimod está probado para el uso para tratar carcinoma celular basal. Otros agonistas de TLR7 incluyen gardiquimod, loxoribinae y bropirimina. El resiquimod también es un agonista de TLR8. Los agonistas de TLR9, tal como CpG, se han usado para tratar carcinoma pulmonar de células no pequeñas, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de células renales y cáncer colorectal.

G6. ADEPT y Terapia Profármaco.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención se pueden usar en unión con profármacos, en donde el anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 se asocia de manera operativa con un componente activador de profármaco, tal como una enzima activadora de profármaco, que convierte un profármaco a la forma más activa solo en el contacto con el anticuerpo. Esta tecnología se llama en general "ADEPT", y se describe, por ejemplo, en WO 95/13095; WO 97/26918, WO 97/24143, y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,975,278 y 5,658,568, cada una incorporada específicamente en la presente como referencia.

El término "profármaco", como se usa en la presente, se refiere a una forma de derivado o precursor de una sustancia biológica o farmacéuticamente activa que ejerce efectos citotóxicos reducidos o de otro modo anti-celulares, reducidos, en células objetivo, incluyendo células endoteliales de la vasculatura tumoral, en comparación al fármaco de origen en el cual se basa. De manera preferente, la forma de profármaco o precursor ejerce efectos citotóxicos o anti-celulares

significativamente reducidos, de manera más preferente, insignificantes en comparación a la forma "nativa" o de origen. Los "profármacos" son capaces de ser activados o convertidos para producir la forma más activa de origen del fármaco.

La capacidad técnica para hacer y usar profármacos existe dentro de la habilidad del experto. Willman et al. (1988) y Stella y Himmelstein (1985) se incorporan cada uno específicamente en la presente como referencia para los propósitos de complementar adicionalmente la descripción y enseñanza con respecto a como hacer y usar varios profármacos. Las construcciones de profármaco de ejemplo que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278), profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos basados en péptidos (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,660,829; 5,587,161; 5,405,990; WO 97/07118), profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,561,119; 5,646,298; 4,904,768, 5,041,424), profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278), profármacos que contienen fenilacetaida opcionalmente sustituida y aún 5-fluorocitosina (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278) y profármacos de 5-fluorouridina y similares, en donde cada una de las patentes se incorpora específicamente en la presente como referencia.

Virtualmente no tiene límites el tipo de agente terapéutico y fármaco citotóxico que se puede usar en la forma de profármaco. Se preferirán los agentes más citotóxicos para una forma de distribución, con respecto, por ejemplo, a la distribución de coagulantes, que es menos preferida para el uso como profármacos. Todo lo que se requiere al formar el profármacos diseñar a construcción de modo que el profármaco sea sustancialmente inactivo y el profármaco "liberado" o activado tenga actividad sustancial, o al menos suficiente para el propósito propuesto.

Se conocen varias mejoras en los profármacos originales y se contemplan para el uso con la presente, como se describe en WO 95/03830; EP 751,144 (antraciclinas); WO 97/07097 (ciclopropilindoles); y WO 96/20169. Por ejemplo, los profármacos con Km reducidas se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,621,002, incorporada específicamente en la presente como referencia, que se puede usar en el contexto de la presente invención. La terapia de profármacos que se lleva a cabo de manera intracelular también se conoce, como se ejemplifica por la WO 96/03151, incorporada específicamente en la presente como referencia, y se puede practicar con la presente.

Para el uso en ADEPT, el agente que activa convierte el profármaco en el fármaco más activo y se une de manera operativa al anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2. El anticuerpo humano anti-VEGF bloqueador de VEGFR2 de esta manera coloca la capacidad

convertidora de profármaco dentro del sitio angiogénico, preferentemente, dentro de la vasculatura y estroma tumoral, de modo que el fármaco activo solo se produce en estas regiones y no en la circulación o en tejidos saludables.

Las enzimas que se pueden unir a los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2, para funcionar en la activación del profármaco incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina para el uso en combinación con profármacos que contienen fosfato (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278); arilsulfatasa para el uso en combinación con profármacos que contienen sulfato (Patente de los Estados Unidos No. 5,270,196); peptidasas y proteasas, tal como serratia-proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasa (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,660,829; 5,587,161; 5,405,990) y catepsinas (incluyendo catepsina B y L), para el uso en combinación con profármacos basados en péptidos; D-alanilcarboxipeptidasas para el uso en combinación con profármacos modificados por D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tal como β-galactosidasa y neuraminidasa para el uso en combinación con profármacos glicosilados (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,561,119; 5,646,298); β-lactamasa para el uso en combinación con profármacos que contienen β-lactama; penicilina-amidasas, tal como penicilina V-amidasa (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278) o penicilina G-amidasa, para el uso en combinación con fármacos derivatizados en sus amino-nitrógenos con grupos

fenoxiacetamida o fenilacetamida; y citosina-desaminasa (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,338,678; 5,545,548) para el uso en combinación con profármacos basados en 5-fluorocitosina (Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278), en donde cada una de las patentes se incorpora específicamente en la presente como referencia.

Los anticuerpos con actividad enzimática, conocidos como anticuerpos catalíticos o "abzimas", también se pueden emplear para convertir profármacos en fármacos activos. Las abzimas basadas en anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 forman de esta manera otro aspecto de la presente invención. La capacidad técnica para elaborar abzimas también existe dentro de la habilidad del experto en la técnica, como se ejemplifica por Massey (1987), incorporada específicamente en la presente como referencia para los propósitos de complementar la enseñanza de abzimas. Los anticuerpos catalíticos capaces de catalizar la descomposición de un profármaco en la posición de carbamato, tal como un aril-carbamato de mostaza de nitrógeno, se contemplan adicionalmente como se describe en la EP 745,673, incorporada específicamente en la presente como referencia.

G7. Combinaciones Oculares

Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la invención se pueden usar en combinación con otras terapias para tratar enfermedades oculares y enfermedades oculares angiogénicas, incluyendo retinopatía diabética, degeneración macular, degeneración macular relacionada a la edad, glaucoma neovascular y otras

enfermedades oculares descritas anteriormente. Los anticuerpos se pueden combinar con cualquier otro método empleado en general en el tratamiento de enfermedades oculares, incluyendo cirugía.

Con respecto a las combinaciones con otros agentes terapéuticos, los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 se pueden administrar antes de, después de o sustancialmente al mismos tiempo como el otro agente terapéutico. Se puede lograr administración sustancialmente simultánea de una composición individual, o de dos composiciones distintas.

Con respecto a la neovascularización coroidal, tal como aquella asociada con degeneración macular, la degeneración macular relacionada a la edad (AMD) y otras indicaciones oculares, ciertas combinaciones preferidas de la invención son aquellas que usan un segundo agente que bloquea, inhibe, reduce, reduce la expresión o antagoniza SPARC (proteína segregada, ácida y rica en cisteína) (Nozaki et al., 2006; U.S. 2006/0135423). Puesto que los anticuerpos de la invención ya bloquean la activación de VEGFR2, pero no la activación de VEGFR1, su combinación con uno o más agentes que bloquean SPARC formará un método particularmente efectivo para reducir adicionalmente la angiogénesis inducida por VEGF en el ojo.

Los inhibidores o antagonistas de SPARC incluyen, por ejemplo, aquellos de los mismos tipos moleculares como se ha desarrollado exitosamente contra el VEGF. Los inhibidores de SPARC de ejemplo incluyen de esta manera anticuerpos anti-SPARC inhibidores y fragmentos de unión a

antígeno de los mismos (por ejemplo, Sweetwyne et al, 2004); estrategias antisentido, tal como aptámeros de ARN aptámeros de ARN/ADN, ARN de lentificación (siARN o ARNi) que lentifican o interfieren con la expresión de SPARC; ribozimas; y otros inhibidores de proteína, de péptido y de molécula pequeña. Muchos de estos inhibidores de SPARC, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales y siARN, están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sigma/Aldrich, Santa Cruz Biotechnology, Inc., R&D Systems. De esta manera se puede usar cualquiera o más de los inhibidores de SPARC en unión con la presente invención para bloquear, inhibir, reducir, reducir la expresión o antagonizar adicionalmente los niveles o actividad de SPARC, ya sea los niveles de ADN, ARN y/o proteína.

H. Diagnóstico y Formación de Imágenes

La presente invención proporciona además métodos de diagnóstico y formación de imágenes *in vitro* e *in vivo*. Estos métodos son aplicables para el uso en la generación de información de diagnóstico, prognóstico o formación de imágenes para cualquiera enfermedad angiogénica, como se ejemplifica por artritis, psoriasis y tumores sólidos pero incluyendo todas las enfermedades angiogénicas descritas en la presente. Fuera del campo de diagnosis y formación de imágenes tumorales, estos aspectos de la invención se prefieren más el uso en las pruebas de diagnóstico *in vitro*, preferentemente ya sea donde las muestras se pueden obtener de manera no invasiva y probar en ensayos de alto rendimiento y/o donde se desee la diagnosis clínica en confirmación ambigua.

H1. Métodos y Kits de Inmunodetección

En modalidades aún adicionales, la presente invención se refiere a métodos de inmunodetección para la unión, purificación, remoción, cuantificación o detección en general de otro modo de VEGF y para diagnosticar enfermedades angiogénicas. Los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención se pueden emplear para detectar VEGF *in vivo* (ver más adelante), en muestras aisladas de tejido, biopsias o hisopos y/o en muestras homogeneizadas de tejido. Estos métodos de detección tienen utilidad diagnóstica evidente, pero también tiene aplicaciones a muestras no clínicas tal como en la titulación de muestras de antígeno, y similares.

Los pasos de varios métodos útiles de inmunodetección se han descrito en la literatura científica, tal como por ejemplo, Nakamura et al. (1986, incorporada en la presente como referencia). En general, los métodos de inmunounión incluyen la obtención de una muestra sospechosa de contener VEGF y poner en contacto la muestra con anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 bajo condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejos. En estos métodos, el anticuerpo se puede enlazar a un soporte sólido, tal como en la forma de una matriz de columna, y la muestra sospechosa de contener VEGF se aplicará al anticuerpo inmovilizado.

De manera más preferentemente, los métodos de inmunounión incluyen métodos para detectar o cuantificar la cantidad de VEGF en una muestra, métodos que requieren la

detección o cuantificación de cualquier complejo inmunitario formado durante el proceso de unión. Aquí, se obtendrá una muestra sospechosa de contener VEGF y poner en contacto la muestra con un anticuerpo de acuerdo con la presente y luego detectar o cuantificar la cantidad de complejos inmunitarios formados bajo las condiciones específicas.

La muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra que sea sospechosa de contener VEGF, en genera de un animal o paciente sospechoso de tener una enfermedad angiogénica. Las muestras pueden ser una sección o espécimen de tejidos, una biopsia, un hisopo o muestra de prueba más pequeña, un extracto homogenizado de tejido o formas separadas o purificadas de éstos.

La puesta en contacto de la muestra biológica elegida con el anticuerpo bajo condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios (complejos inmunitarios primarios) en general es una material de adición simplemente de una composición de anticuerpo a la muestra y la incubación de la muestra durante un período de tiempo suficientemente prolongado para que los anticuerpos formen complejos inmunitarios con, es decir, se unan a, cualquier VEGF presente. Después de este tiempo, la composición de muestra-anticuerpo, tal como una sección de tejido, placa de ELISA, transferencia de punto o transferencia western, se lavará en general para remover cualquier especie de anticuerpo no unida de manera específica, permitiendo que se detecten solo aquellos anticuerpos unidos

específicamente dentro de los complejos inmunitarios primarios.

La detección de formación de inmunocomplejo es bien conocida en la técnica y se puede lograr a través de la aplicación en numerosos planteamientos. Estos métodos se basan en general en la detección de una marca o marcador, tal como cualquier marca o marbete radioactivo, fluorescente, biológico o enzimático conocido en la técnica. Las patentes de los Estados Unidos que se refieren al uso de estas marcas incluyen 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,242, cada una incorporada en la presente como referencia. En general, se prefiere el uso de enzimas que generan un producto coloreado en el contacto con un sustrato cromogénico. El ligando secundario de unión, tal como un segundo anticuerpo o un arreglo de unión de ligando de biotina/avidina, también se puede usar, como se conoce en la técnica.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, empleados en la detección, se pueden enlazar por sí mismos a una marca detectable, en donde simplemente se detectará entonces esta marca, permitiendo que se determine la cantidad de los inmunocomplejos primarios en la composición.

De manera preferente, los inmunocomplejos primarios se detectan por medio de un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión para los anticuerpos de la invención. En estos casos, el segundo ligando de unión se puede enlazar a una marca detectable. El segundo

ligando de unión es en sí mismo frecuentemente un anticuerpo, y de esta manera se puede llamar un anticuerpo "secundario". Los inmunocomplejos primarios se ponen en contacto con el ligando secundario de unión, marcado, o anticuerpo, bajo condiciones efectivas y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios entonces se lavan en general para remover cualquier anticuerpo o ligando secundario, marcado, no unido de manera específica, y entonces se detecta la marca restante en los inmunocomplejos secundarios.

Los métodos adicionales incluyen la detección de inmunocomplejos primarios por un planteamiento de dos pasos. Un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión para el primer anticuerpo se usa para formar inmunocomplejos secundarios, como se describe anteriormente. Después del lavado, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con un tercer ligando o anticuerpo de unión que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, nuevamente bajo condiciones efectivas y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se enlaza a una marca detectable, que permite la detección de los inmunocomplejos terciarios formados de esta manera. Este sistema puede proporcionar amplificación de señal, si así se desea.

En la diagnosis o monitoreo clínico de pacientes con una enfermedad angiogénica, la detección de VEGF, o un

incremento en los niveles de VEGF, en comparación a los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal es indicativa de un paciente con una enfermedad angiogénica.

Sin embargo, como se conoce por aquellos expertos en la técnica, esta diagnosis clínica probablemente no se hará con base en este método en el aislamiento. Aquellos expertos en la técnica están familiarizados con la diferenciación entre expresión significativa de un biomarcador, que representa una identificación positiva, y la expresión de bajo nivel o de fondo de un biomarcador. En realidad, frecuentemente se usan niveles de expresión de fondo para formar un "corte" por arriba de lo cual se puntuará la tinción incrementada como significativa o positiva.

H2. Formación de Imágenes

Estos aspectos de la invención se prefieren para el uso en métodos de formación de imágenes de tumores y métodos combinados de tratamiento tumoral y formación de imágenes. Los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 que se enlazan a uno o más agentes detectables se contemplan para el uso en la formación de imágenes, *per se*, o para la pre-formación de imágenes del tumor para formar una imagen confiable antes del tratamiento. Estas composiciones y métodos también se pueden aplicar a la formación de imágenes y diagnosis de cualquier otra enfermedad o condición angiogénica, particularmente tumores no malignos, aterosclerosis y condiciones en las cuales se desea una imagen inteARN para propósitos de diagnóstico o

pronóstico o para diseñar el tratamiento.

Los anticuerpos de la formación en imágenes de anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, comprenderán en general un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 unido operativamente, o conjugado a, una marca detectable. Las "marcas detectables" son compuestos o elementos que se pueden detectar debido a sus propiedades funcionales específicas, o características químicas, el uso de lo cual permite que el componente al cual se unen se detecte, y se cuantifique además si se desea. En los conjugados de anticuerpo para protocolos de diagnóstico *in vivo* o las marcas de los "métodos de formación de imágenes" se requiere que se puedan detectar usando métodos no invasivos.

En la técnica se conocen muchos agentes apropiados de formación de imágenes, puesto que son métodos para su unión a anticuerpos y ligandos de unión (ver, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos números 5,021,236 y 4,472,509, ambas de las cuales se incorporan en la presente como referencia). Ciertos métodos de unión comprenden el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelador orgánico tal como DTPA unido al anticuerpo (patente de los Estados Unidos número 4,472,509). También se pueden hacer reaccionar anticuerpos monoclonales con una enzima en la presencia de un agente acoplador tal como glutaraldehído o periodato. Se preparan conjugados con marcadores de fluoresceína en la presencia de estos agentes acopladores o por reacción con un isotiocianato.

Un ejemplo de marcas detectables son los iones paramagnéticos. En este caso, los iones adecuados incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III), con el gadolinio que es particularmente preferido.

Los iones útiles en otros contextos, tal como formación de imágenes por rayos X, incluyen, pero no se limitan a, lantano (III), oro (III), plomo (II), y especialmente bismuto (III). Las marcas fluorescentes incluyen rodamina, fluoresceína y renografina. Frecuentemente se enlazan rodamina y fluoresceína mediante un compuesto intermedio de isotiocianato.

En el caso de isotopos radioactivos para aplicaciones diagnósticas, los ejemplos adecuados incluyen $^{14}$carbon, $^{51}$cromio, $^{36}$cloro, $^{57}$cobalto, $^{58}$cobalto, cobre$^{67}$, $^{152}$Eu, galio$^{67}$, $^{3}$hidrógeno, yodo$^{123}$, yodo$^{125}$, yodo$^{131}$, indio$^{111}$, $^{59}$hierro, $^{32}$fósforo, renio$^{186}$, renio$^{188}$, $^{75}$selenio, $^{35}$azufre, tecnecio$^{99m}$ e itrio$^{90}$. Frecuentemente es preferido $^{125}$I para el uso en ciertas modalidades, y también se prefieren frecuentemente tecnicio$^{99m}$ e indio$^{111}$ debido a su menor energía y adecuabilidad para detección de largo alcance.

Los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, radioactivamente marcados, para el uso en la presente invención, se pueden producir de acuerdo a métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, losa grupos funcionales intermedios que frecuentemente se usan para unir iones metálicos radioisotópicos a anticuerpos son

ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y ácido etilen-diaminatetracético (EDTA).

También se pueden yodar anticuerpos monoclonales por contacto con yoduro de sodio o potasio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa. Los anticuerpos de acuerdo a la invención se pueden marcar con tecnecio-$^{99}$m por proceso de intercambio de ligando, por ejemplo, al reducir pertecnato con solución estannosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna de Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna, o por técnicas de marcación directa, por ejemplo, al incubar pertecnato, un agente reductor tal como $SNCl_2$, una solución amortiguadora tal como solución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo.

Se puede usar cualquiera de los tipos anteriores de anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2, marcados de manera detectable en la formación de imágenes o aspectos combinados de formación de imágenes y tratamiento de la presente invención. Son igualmente adecuados para el uso en diagnóstico *in vitro*. Las dosis para modalidades de formación de imágenes in vivo en general son menos para terapia, pero también son dependientes de la edad y del peso del paciente. Debe ser suficiente dosis de una vez.

Los métodos de diagnóstico o formación de imágenes, in vivo, comprenden en general administrar a un paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 que se conjuga a un marcador que es detectable por métodos no

invasivos. El conjugado de anticuerpo-marcador se deja suficiente tiempo para localizar y unirse a VEGF dentro del tumor. El paciente entonces se expone a un dispositivo de detección para identificar el marcador detectable, formando de esta manera una imagen del tumor.

H3. Kits de Diagnóstico

En modalidades aún adicionales, la presente invención proporciona kits de diagnóstico, que incluyen kits tanto de inmunodetección como de formación de imágenes, para el uso con los métodos de inmunodetección y formación de imágenes, descritos anteriormente. Por consiguiente, los anticuerpos humanos anti-VEGF, bloqueadores de VEGFR2 se proporcionan en el kit, comprendido en general dentro de un recipiente adecuado.

Para inmunodetección, los anticuerpos se pueden unir a un soporte sólido, tal como una concavidad de una placa de microtítulo, aunque se prefieren soluciones de anticuerpo o polvos para reconstitución. Los kits de inmunodetección comprenden de manera preferente al menos un primer reactivo de inmunodetección. Los reactivos de inmunodetección del kit pueden tomar cualquiera de una variedad de formas, incluyendo aquellas marcas detectables que estén asociadas con o enlazadas al anticuerpo determinado. También se contemplan marcas detectables que se asocian con o se unen a un ligando secundario de unión. Los ligandos secundarios de ejemplo son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión para el primer anticuerpo.

Los reactivos de inmunodetección, adecuados, adicionales

para el uso en los presentes kits incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión para el primer anticuerpo, junto con un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, el tercer anticuerpo que se enlaza a una marca detectable. Como se señala anteriormente, se conocen en la técnica varias marcas de ejemplo y todas estas marcas se pueden emplear en unión con la presente invención. Estos kits pueden contener conjugados de anticuerpo-marca ya sea en una forma completamente conjugada, en la forma de compuestos intermedios, o como porciones separadas que se van a conjugar por el usuario del kit.

Los kits de formación de imágenes comprenderán de manera preferente un anticuerpo humano anti-VEGF, bloqueador de VEGFR2 que ya está unido a una marca detectable in vivo. Sin embargo, se puede suministrar de manera separada la marca y el medio de unión.

Cualquier kit puede comprender adicionalmente agentes de control, tal como composiciones adecuadamente en alícuotas de VEGF, ya sea marcado o no marcado, como se pueda usar para preparar una curva normal para un ensayo de detección. Los componentes de los kits se pueden envasar ya sea en medios acuosos o en forma liofilizada.

El medio de recipiente de los kits incluirá en general al menos un frasco, tubo de prueba, matraz, botella, jeringa u otro medio de recipiente, en el cual se puede colocar el anticuerpo o antígeno, y de manera preferente, se toma de manera adecuada en alícuotas. Donde se proporciona un segundo o tercer ligando de unión o componente adicional, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el cual

se puede colocar este ligando o componente. Los kits también pueden incluir otros reactivos de diagnóstico para el uso en la diagnosis de cualquiera o más enfermedades angiogénicas. De manera preferente, se usarán segundos diagnósticos no basados en la unión de VEGF.

Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el anticuerpo, y cualquier otro recipiente de reactivos en confinamiento cercano para venta comercial. Estos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los cuales están contenidos los frascos deseados.

Tabla 1

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia |
|---|---|---|
| Clon EJ173-112-C11 (r84 scFv) | | |
| 1 | Dominio VH (nt) | CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTAT GCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACA AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTG AAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATC TACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCAT TATACCTTTTAACGGTATGGACGTCTGGGGCC AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA<br><br>Ver Figuras 1A-1B |
| 2 | Dominio VL (nt) | GACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCA ACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA<br><br>Ver Figuras 1A-1B |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia |
|---|---|---|
| 3 | Dominio VH (aa) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT MTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVR GVIIPFNGMDVWGQGTTVTVSS<br><br>Ver Figuras 1A-1B |
| 4 | Dominio VL (aa) | DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK<br><br>Ver Figuras 1A-1B |
| 5 | CDR1 pesada | SYAIS |
| 6 | CDR2 pesada | GFDPEDGETIYAQKFQG |
| 7 | CDR3 pesada | GRSMVRGVIIPFNGMDV |
| 8 | CDR1 ligera | RASQSISSYLN |
| 9 | CDR2 ligera | AASSLQS |
| 10 | CDR3 ligera | QQSYSTPLT |
| 11 | FR1 pesada | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFS |
| 12 | FR2 pesada | WVRQAPGQGLEWMG |
| 13 | FR3 pesada | RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT |
| 14 | FR4 pesada | WGQGTTVTVSS |
| 15 | FR1 ligera | DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITC |
| 16 | FR2 ligera | WYQQKPGKAPKLLIY |
| 17 | FR3 ligera | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC |
| 18 | FR4 ligera | FGGGTKVEIK |
| 19 | Ligador | KLSGSASAPKLEEGEFSEARV |
| 20 | Clon de scFv completo (nt) | Ver Figuras 1A-1B |
| 21 | Clon de scFv | Ver Figuras 1A-1B |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia |
|---|---|---|
| | completo (aa) | |
| IgG de longitud completa r84 | | |
| 22 | Cadena pesada de IgG (nt) | Ver Ejemplo 6 |
| 23 | Cadena ligera de IgG (nt) | Ver Ejemplo 6 |
| 24 | Cadena pesada de IgG (aa) | Ver Ejemplo 6 |
| 25 | Cadena ligera de IgG (aa) | Ver Ejemplo 6 |
| 26 | Dominio VH de IgG (nt) | Ver Ejemplo 6 |
| 27 | Dominio VL de IgG (nt) | Ver Ejemplo 6 |

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y de esta manera se pueden considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica

deben apreciar, en vista de la presente descripción, que se pueden hacer muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y obtener aún un resultado similar o igual sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de Anticuerpo

El VEGF es un regulador clave de la angiogénesis fisiológica durante la embriogénesis, crecimiento esquelético, y funciones reproductivas. La señalización de VEGF a través de la interacción con el receptor de tirosina-cinasa, VEGFR2, también es importante en la angiogénesis patológica, incluyendo aquella asociada con crecimiento tumoral. Dada la necesidad de anticuerpos humanos, terapéuticos, específicos que bloqueen la angiogénesis, se han identificado anticuerpos humanos que son reactivos contra un epítopo en VEGF que bloquea de manera específica y sustancial su interacción con VEGFR2 (KDR/Flk-1), pero no bloquean de manera sustancial su interacción con VEGFR1 (Flt-1).

Se clonaron formas de cadena individual de los anticuerpos en el plásmido pHOG21 (Kipriyanov et al., 1996; 1997) (Figura 9A y Figura 9B) (en los sitios de restricción NcoI y NotI), que contiene los epitopes de marca c-myc y 6xHis. Se transformaron células de *E. coli,* XL-1 azul, seleccionadas en placas de ampicilina y el scFv se expresó en la inducción por IPTG. Se probaron los scFv purificados por ELISA para la actividad biológica selectiva contra VEGF. La actividad biológica selectiva se confirmó adicionalmente por ensayos competitivos de ELISA usando el

anticuerpo murino 2C3, que bloquea de manera específica la interacción de VEGF y VEGFR2 y no la interacción de VEGF y VEGFR1 (Brekken et al., 1998; 2000). También, Biacore mostró la unión de los anticuerpos scFv a VEGF-A inmovilizado. También se valoró la unión a VEGF murino así como a VEGF humano.

A. Secuenciación

Se muestran las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de un clon preferido productor de anticuerpo. El anticuerpo se designa como EJ173/112-C11 (r84/PGN311) y se ha producido tanto en una forma de scFv (Ejemplo 1 y Figuras 1A-1B) y en una forma de IgG de longitud completa (Ejemplo 6). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de una forma de cadena individual de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se muestran en la Figuras 1A-1B y en la Tabla 1. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de una forma de IgG de longitud completa de r84/PGN311 se muestra en el Ejemplo 6. Las regiones CDR y menos variables de las cadenas ligera y pesada de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 2: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se Une a VEGF con Alta Afinidad

Para confirmar la especificidad del anticuerpo, se probó la unión de la forma tipo scFv de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) en ELISA contra VEGF-A humano colocado en placa (obtenido de Dr. Rolf A. Brekken, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas). De forma breve, se

colocaron en una placa de poliestireno 2 µg/ml de VEGF-A. Entonces, se adicionaron 20 µg/ml de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv purificado a la primera concavidad, y se tituló con diluciones de 3 veces. Se detectó el scFv unido con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-marca c-myc (Invitrogen) y anticuerpo anti-ratón de conejo, secundario, conjugado a HRP.

Los resultados de ELISA mostraron que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv (Figura 2) se unió a VEGF y de manera importante, tiene una señal incrementada de unión, y por lo tanto afinidad incrementada, en comparación a su clon madre. El anticuerpo B9 murino se usa como un control positivo y es un anticuerpo scFv murino contra VEGF-A humano (obtenido de Dr. Philip E. Thorpe, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas).

El EJ173/112-C11 (r84/PGN311) mostró características benéficas adicionales con respecto al clon madre. Se mostró que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) tiene una mayor estabilidad en suero y una tendencia reducida para formar agregados en el formato tipo scFv en comparación al clon madre (datos no mostrados).

Transposición de la Cadena Pesada de Región Variable de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) con Siete Cadenas Pesadas Diferentes de Otros Anticuerpos anti-VEGF

La cadena ligera de región variable de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se combino con siete diferentes cadenas pesadas de región variable derivadas de otros clones de anticuerpo anti-VEGF distintos de r84/PGN311 para confirmar la importancia de la región variable de cadena ligera de

r84/PGN311 en el mantenimiento de la propiedad de unión a VEGF. Los clones resultantes se expresaron y purificaron mediante su marca His en columnas NiNTA. Después de la purificación, se determinó la concentración, y un ELISA contra VEGF-A humano colocado en placa se corrió. Se adicionaron 20 µg/ml de scFv purificado y el scFv unido se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-marca c-myc (Invitrogen) y anticuerpo anti-ratón de conejo secundario conjugado a HRP.

Se mostró que tres de las siete combinaciones de cadena ligera de región variable de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) con cadenas pesadas de región variable derivadas de otros clones de anticuerpo anti-VEGF mostraron unión significativa a VEGF en este ELISA. Ésta es una proporción muy razonable y demuestra que la región variable de cadena ligera de r84/PGN311 es importante para mantener la unión a VEGF y también que se pueden identificar fácilmente otras regiones variables de cadena pesada que se pueden combinar con esta región variable de cadena ligera para dar lugar a anticuerpos que se unen a VEGF.

Ejemplo 3: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) Compite con 2C3 Murino

Para demostrar adicionalmente la especificidad del anticuerpo, se probó la unión de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) en la presencia de dos concentraciones de 2C3 en un ELISA contra VEGF-A colocado en placa. De manera breve, se colocaron en placa 2 µg/ml de VEGF-A en una placa de poliestireno. Entonces, se adicionó 1 µg/ml de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv purificado, el clon madre o

scFv B9 murino (Figura 3) a seis concavidades paralelas, de lo cual dos contuvieron 0.1 µg y dos contuvieron 1 µg de IgG de 2C3 murino, que da por resultado una concentración final de 1 y 10 µg/ml, respectivamente, de IgG de 2C3. El scFv unido restante se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-marca c-myc conjugado a HRP (Invitrogen).

LA UNIÓN DE EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv a VEGF se redujo por competición con concentraciones crecientes de IgG de 2C3. Estos resultados muestran por lo tanto que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) compite de manera efectiva con el anticuerpo 2C3 para la unión a VEGF, indicando que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se une a sustancialmente el mismo epítopo como 2C3.

Ejemplo 4: EJ173/112-C11 (r84/PGN311) se Une a VEGF Humano y de Ratón

La unión de EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv a VEGF humano y murino se determinó. Se colocó en inmunoplacas de poliestireno 1 µg/ml de VEGF murino (R&D Systems 493-MV-005/CF, VEGF164 murino libre de portador) y VEGF humano. Se adicionaron 10 µg/ml de scFv purificado y se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-marca c-myc (Invitrogen) y anticuerpo anti-ratón de conejo secundario conjugado a HRP.

Los resultados mostraron que EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv (Figura 4) se une tanto a VEGF murino como a VEGF humano.

Además, se usó Biacore T100 para valorar la afinidad de unión de las isoformas tipo scFv de r84 y su clon madre a VEGF de ratón. Para este fin, se inmovilizó

1000 RU de $VEGF_{164}$ de ratón recombinante (493-MV/CF, R&D Systems) en un chip CM5 (Biacore), y una serie de diluciones (100 nM y diluciones de 2 veces) de scFv monomérico se hizo rebosar a una velocidad de flujo de 50 µl/min. La afinidad de unión expresada como la $K_D$ se calculó por el modelo de ajuste 1:1 usando el software que corresponde a la máquina Biacore T100. Los valores de $K_D$ se calcularon como $1.0 \times 10^{-8}$ M para EJ173-112-C11 (r84/PGN311) y $4.0 \times 10^{-8}$ M para el clon madre. De esta manera r84/PGN311 muestra una mayor afinidad de unión que el clon madre para VEGF murino.

Estos resultados indican que este anticuerpo seleccionado (r84/PGN311) es adecuado para el uso tanto en estudios pre-clínicos en ratones como para el uso en humanos.

Como se detalla más adelante en el Ejemplo 6, se han generado formas de IgG quiméricos completamente humanas y murinas del anticuerpo r84. Los estudios de unión de ELISA confirmaron que cada uno de estos anticuerpos r84 en el formato IgG también se une tanto a VEGF murino como VEGF humano (Figuras 1A-1B9). Estos resultados muestran otra ventaja del anticuerpo r84 completamente humano, seleccionado con respecto al anticuerpo 2C3, puesto que 2C3 no exhibe unión significativa a VEGF murino.

La ausencia de unión significativa de 2C3 a VEGF murino se ha demostrado en un ensayo ELISA indirecto. En este ensayo, se valoró la interacción de 2C3 con VEGF humano y de ratón así como a otros miembros de la familia de VEGF.

Los ensayos ELISA indirectos se realizaron esencialmente como se describe en Brekken et al., Cancer Research 1998 y 2000. De forma breve, se compraron varios factores de crecimiento, es decir, VEGF-A humano (VEGF), VEGF de ratón, PIGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, de R&D Systems y se revistieron en las concavidades de una placa de ELISA (50 µl/concavidad a 0.5 g/ml en amortiguador sensibilizador, durante la noche a 4°C). Las concavidades se bloquearon en CAH al 5% (hidrolisado ácido de caseína, Sigma, hecho en PBS) durante 1 hora a 37°C y se incubó en triplicado con el anticuerpo anti-VEGF 2C3 a 1.0 µg/ml durante 2 horas a temperatura ambiente. La unión se detectó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ya sea IgG anti-humano o anti-ratón, diluido 1:5000). Las concavidades se revelaron con TMB (un sustrato colorimétrico para HRP) y la absorbancia se leyó a 450 nM. Los valores medios de absorbancia son como sigue: VEGF-A humano (3.07), VEGF de ratón (0.09) que fue el mismo como la señal de fondo, PIGF (0.1), VEGF-B (0.09), VEGF-C (0.09) y VEGF-D (0.12).

Los resultados demuestran que 2C3 se une a VEGF-A humano pero no reacciona con VEGF-A de ratón, PIGF, VEGF-B, VEGF-C, o VEGF-D. Este ensayo se ha reproducido varias veces con los mismos resultados.

Se ha obtenido evidencia adicional que la forma tipo IgG del anticuerpo r84/PGN311 se une a VEGF de ratón, en tanto que 2C3 y Avastin no se une a VEGF de ratón, en experimentos en los cuales se han evaluado los niveles de VEGF de ratón en suero en animales tratados con r84, 2C3 y

Avastin.

Los sueros de animales que tienen tumor tratados con una IgG de control (Synagis), avastin, 2C3 o r84 se recolectaron y analizaron por ELISA para el nivel de VEGF de ratón usando un kit de R&D systems. Además, algunas muestras de suero de ratones tratados con r84 se inmunoagotaron de todos los anticuerpos por incubación con perlas de proteína G.

Los resultados se muestran en la Figura 24. El nivel de suero de VEGF de ratón es muy similar entre los animales de control, tratados con avastin y tratados con 2C3. Sin embargo, el nivel en suero de VEGF de ratón es dramáticamente mayor en animales tratados con r84. La diferencia en el nivel de VEGF de ratón entre aquel observado con los animales de control, tratados con avastin y 2C3 y aquel observado con los animales tratados con r84 es evidencia que los anticuerpos de control, avastin y 2C3 no se unen a VEGF de ratón, en tanto que el anticuerpo r84 tipo IgG se une a VEGF de ratón.

La columna "r84" en la Figura 24 muestra la cantidad total de VEGF en los sueros (es decir, VEGF (biológicamente activo) y VEGF vuelto complejo con r84). Se cree que la cantidad de VEGF libre (biológicamente activo) es un parámetro importante que se va a medir cuando se usan terapéuticamente los anticuerpos anti-VEGF, en particular para valorar la efectividad del anticuerpo en la unión a VEGF (Loupakis et al., 2007). La columna "r84 supe" muestra la cantidad de VEGF libre en los sueros después de que se removieron la inmunoglobulina r84 y r84

unido a VEGF murino mediante incubación con proteína G. La Figura 24 muestra de esta manera que los niveles de VEGF libre de ratón en el suero de animales tratados con r84 están en niveles de línea base. De esta manera, los resultados en la Figura 24 no sólo demuestran que r84 se une bien a VEGF de ratón sino también demuestran que r84 es muy efectivo a niveles agotadores de VEGF libre (biológicamente activo) en suero, que es una propiedad importante para el uso en terapia.

Los resultados analizados en el Ejemplo 11E posterior que usa un modelo de tumor mamario de ratón singeneico y que muestra que r84 quimérico de ratón mejoró significativamente la supervivencia de ratones que tienen tumor, es validación adicional que r84 une y bloquea la actividad de VEGF de ratón in vivo.

Los resultados descritos anteriormente, muestran que el anticuerpo r84/PGN311 completamente humano se une tanto a VEGF murino como a VEGF humano, en tanto que los anticuerpos 2C3 y Avastin nos e unen a VEGF murino. Esto es una ventaja importante en términos de ser capaces de usar r84 para valorar por ejemplo actividad anti-tumoral tanto en modelos singeneicos de ratón, es decir, donde se administran células tumorales de ratón a ratones y en modelos de xenoinjerto, es decir, donde se administran células tumorales humanas a ratones.

Además, la capacidad para unirse tanto a VEGF de humano como de ratón como se muestra por r84/PGN311 pero no por los anticuerpos tal como 2C3 y Avastin, significa que los resultados mostrados por r84 en los modelos de

xenoinjerto de ratón son más probablemente representativos de la actividad de r84 en sujetos humanos, es decir, los resultados con r84 en modelos pre-clínicos de ratón probablemente van a ser un buen modelo para lo que se verá cuando el anticuerpo se ponga en pacientes. La razón para esto es que los anticuerpos que sólo pueden unirse a VEGF humano (por ejemplo, Avastin y 2C3) se unirán a VEGF producido por las células tumorales humanas pero no serán capaces de unirse a VEGF murino endógeno. Por supuesto, esto es diferente de la situación en un paciente humano, en el cual se presentarán el VEGF producido por el tumor y el VEGF endógeno.

La desventaja potencial con esta situación es que un anticuerpo que se una tanto a VEGF humano pero no a VEGF de ratón puede desempeñarse bien en un modelo de xenoinjerto de ratón pero esto no se reflejará por un desempeño similar en un sistema humano donde estuvo presente mucho más VEGF. En otras palabras, el efecto anti-tumoral visto en un sistema de xenoinjerto de ratón con un anticuerpo que sólo puede unirse a VEGF humano puede mirarse mejor que la realidad clínica. En contraste, si se está trabajando con un anticuerpo que se una tanto a VEGF humano como de ratón, entonces esto se unirá a todas las formas de VEGF presentes en el sistema de modelo de ratón y es probable que sea mucho más representativo de la situación cuando el anticuerpo se ponga en humanos. Ésta es una ventaja importante y una que se presenta por los anticuerpos de la invención.

Ejemplo 5: Afinidad de Unión de EJ173-112-C11 (r84/PGN311)

Se usó Biacore para valorar la afinidad de unión de varios anticuerpos. Se desbordaron diferentes anticuerpos scFv a una concentración de 1 µM (micromolar) sobre un chip CM5 con VEGF inmovilizado (acoplamiento de amina). En la Figura 5 se muestran las curvas de unión, donde se puede ver que la forma scFv de r84/PGN311 tiene una notablemente mayor afinidad de unión que la forma de cadena individual del clon madre (m).

Además, se llevaron a cabo estudios iniciales para calcular la afinidad de unión de IgG de r84 para VEGF, en los cuales se desbordaron varias concentraciones de IgG de r84 sobre VEGF-A inmovilizado. A este respecto, se calculó la afinidad de unión, expresada como la $K_d$, usando el modelo de unión 1:1 en el software de Evaluación Biacore 3000. El valor de $K_D$ obtenido para IgG de r84 en este estudio inicial se calculó como $6.7 \times 10^{-9}$ M.

Estudios subsiguientes de afinidad que usan BiaCore han producido los datos de afinidad mostrados en la Tabla 2. Para estos experimentos, se determinó la afinidad de los formatos de IgG de EJ173-112-C11 (r84/PGN311) y 2C3 al inmovilizar 100 RU de VEGF-A humano en un chip CM5 (Biacore). Se desbordó una serie de diluciones (100 nM y diluciones de 2 veces) de cada IgG sobre la celda de flujo revestida con VEGF a una velocidad de flujo de 50 µl/min. La señal de fondo de una celda de flujo revestida con BSA se sustrajo de las curvas de unión. La afinidad de unión expresada como la $K_D$ se calculó por el modelo de ajuste 1:1 usando el software que corresponde a la máquina Biacore T100.

Tabla 2

| KD (M) | VEGF revestido (100 RU), 25°C | VEGF revestido (100 RU), 37°C |
|---|---|---|
| 2C3 | $1.24 \times 10^{-8}$ | $3.13 \times 10^{-7}$ |
| r84 | $3.21 \times 10^{-9}$ | $5.22 \times 10^{-9}$ |

Los datos muestran que r84 se une a VEGF con afinidad superior que 2C3 tanto a 25°C como a 37°C. Es razonable esperar que esta diferencia conduzca a características superiores de r84 en comparación a 2C3 en muchos escenarios clínicos relacionados al tratamiento de enfermedades angiogénicas, incluyendo cáncer. Los resultados a 37°C son particularmente interesantes puesto que ésta es la temperatura a la que se someterán los anticuerpos cuando se usen in vivo. También se debe señalar, que en este experimento, Avastin mostró una pérdida de aproximadamente 10 veces en la afinidad en comparación con la unión a 25°C y 37°C, en tanto que r84 es menos sensible a la temperatura (reducción de KD no incluyendo 2 veces).

Ejemplo 6: Conversión de la Forma scFv de r84/PGN311 a las Formas tipo IgG

Primero se construyó una forma tipo IgG completamente humana de r84, como sigue. Las cadenas VH y VL de la forma scFv de la secuencia de anticuerpo r84/PGN311 como se muestra en la Figuras 1A-1B se tomaron y se insertaron en vectores de expresión kappa y pCon IgG1a de Lonza y luego se combinaron para crear un vector que contiene el gen completo del anticuerpo r84. Para elaborar

el anticuerpo de IgG de longitud completa, entonces el vector se transfectó en células CHO KISV.

Una vez que se optimizaron las condiciones de crecimiento, la velocidad de producción de la línea celular fue de aproximadamente 5 miligramos de anticuerpo por litro de cultivo celular. Aunque este método de expresión fue efectivo, no todo el anticuerpo purificado fue estable. Después de la optimización por amortiguador, se redujo la agregación del anticuerpo, logrando 89.5% de monómero y 10.5% de agregado.

Las condiciones optimizadas de crecimiento usadas fueron Invitrogen CD-CHO con MSX 40 µM, pH 6.8-7.0, $CO_2$ al 5%, 37°C. El amortiguador optimizado usado es fosfato de sodio 10 mM, acetato de sodio 25 mM, glicina 50 mM a pH 5.5.

A fin de incrementar adicionalmente la estabilidad de r84/PGN311, la secuencia de aminoácidos se analizó. Comparando la secuencia r84 a secuencias humanas típicas de anticuerpo indicó que el último aminoácido de la cadena VL de r84 estuvo ausente en la construcción que se usa (es decir, el último residuo de Lisina, K, estuvo ausente). Este residuo se reintrodujo. También se cambió la secuencia de ADN (sin cambiar la secuencia de aminoácidos traducida) para ser más "compatible" con las células CHO. El resultado fue una nueva secuencia de ADN, y una secuencia de aminoácidos en la cual la cadena VL terminó en Lisina. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las nuevas cadenas pesada y ligera completa del anticuerpo de IgG se muestran a

continuación:

Cadena pesada de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTTAGCT
GCAAGGCATCTGGTGGGACATTTTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTTCGGCAGGCTCCCGGACAG
GGCCTGGAGTGGATGGGGGGGTTCGATCCCGAAGACGGAGAGACCATTTACGCACAGAAGTTTC
AGGGTCGCGTGACCATGACCGAGGATACTTCTACCGACACAGCATATATGGAGCTCAGTAGCTT
GCGCTCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGCGCGGGGTAATC
ATCCCTTTCAACGGGATGGATGTATGGGGCCAAGGGACCACCGTGACAGTCAGCTCTGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCT
GCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGC
AGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGA
GAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCTAACCCAGGCC
CTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGC
CCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCT
CCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA
TGCCCACCGTGCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCC
CTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTC
CTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGC
CCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

(SEQ ID NO: 22)

Cadena pesada de IgG de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQ
GRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIPFNGMDVWGQGTTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 24)

Cadena ligera de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

GACATTCGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTTGAGCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTTACTATCAC
TTGTCGAGCCTCTCAATCCATCAGCTCCTACTTGAACTGGTACCAGCAGAAACCCGGGAAAGCA
CCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCCTCCTCCCTGCAATCCGGAGTGCCCTCCCGGTTCAGCGGCTC
CGGCTCTGGAACAGACTTTACCCTGACCATTTCTTCTTTGCAGCCTGAGGATTTTGCTACTTACT
ACTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTTGACATTCGGTGGTGGAACGAAAGTAGAAATTAAGCG
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA
TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA
G

(SEQ ID NO: 23)

Cadena ligera de IgG de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 25)

Las nuevas secuencias de ADN de r84/PGN311 mostradas anteriormente se insertaron en vectores de expresión pCon IgG1a y kappa de Lonza y luego se combinaron para crear un vector que contiene la secuencia completa del anticuerpo r84/PGN311. El vector entonces se transfectó con células CHO KISV. Se incrementó la producción de anticuerpo a más de 350 miligramos por litro con poca optimización de cultivo celular. De manera aún más importante, el anticuerpo fue mucho más estable, con monómero de más de 99%.

Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas ligeras variables y pesadas variables de la forma tipo IgG de r84/PGN311 se muestran a continuación:

Cadena VH de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTTAGCT
GCAAGGCATCTGGTGGGACATTTTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTTCGGCAGGCTCCCGGACAG
GGCCTGGAGTGGATGGGGGGGTTCGATCCCGAAGACGGAGAGACCATTTACGCACAGAAGTTTC
AGGGTCGCGTGACCATGACCGAGGATACTTCTACCGACACAGCATATATGGAGCTCAGTAGCTT
GCGCTCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGCGCGGGGTAATC
ATCCCTTTCAACGGGATGGATGTATGGGGCCAAGGGACCACCGTGACAGTCAGCTCT

(SEQ ID NO: 26)

Cadena VL de IgG de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

GACATTCGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTTGAGCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTTACTATCAC
TTGTCGAGCCTCTCAATCCATCAGCTCCTACTTGAACTGGTACCAGCAGAAACCCGGGAAAGCA
CCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCCTCCTCCCTGCAATCCGGAGTGCCCTCCCGGTTCAGCGGCTC
CGGCTCTGGAACAGACTTTACCCTGACCATTTCTTCTTTGCAGCCTGAGGATTTTGCTACTTACT
ACTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTTGACATTCGGTGGTGGAACGAAAGTAGAAATTAAG

(SEQ ID NO: 27)

También se construyó una versión quimérica murina del anticuerpo r84. Esto se realizó para unir la región variable completamente humana a una región constante de ratón, proporcionando un anticuerpo de ratón para el uso en ciertos estudios preclínicos en ratones. La generación del anticuerpo quimérico murino se realizó como se describe anteriormente para la IgG completamente humana, pero uniendo una secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable completamente humana a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región constante de ratón.

Las secuencias de nucleótidos de aminoácidos de las nuevas cadenas completas pesada y ligera del anticuerpo tipo IgG, quimérico, murino se muestran a continuación:

Cadena pesada quimérica de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCAT
TATACCTTTTAACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCACGCGCCG
ATGCTGCACCGACTGTCTATCCACTGGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACT
CTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTCTGGATCCCT
GTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAG
TGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAG
CAGCACCAAGGTGGACAAGAAAGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAA
TGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGT
ACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
GATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATA

GAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGAT
GAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACC
ATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAG
AGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTA
CGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGA
CTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGA
AATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTC
CCGGACTCCGGGTAAATGA

(SEQ ID NO: 31)

Cadena pesada quimérica de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQ
GRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIPFNGMDVWGQGTTVTVSSRADA
APTVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTS
STWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTC
VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNK
DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN
TEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO: 32)

Cadena ligera quimérica de r84/PGN311 (secuencia de ácido nucleico)

GATATCAGGATGACGCAGAGTCCAAGCTCTCTGTCTGCCTCTGTGGGGGACAGGGTGACTATTA
CTTGTCGGGCATCACAGAGTATCTCCAGCTACCTTAATTGGTACCAGCAAAAGCCCGGCAAAGC
CCCCAAATTGCTGATTTACGCAGCCAGCTCCCTTCAGTCTGGCGTCCCTAGCCGCTTCTCCGGGA
GCGGATCAGGCACAGACTTTACGTTGACAATCAGTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTTGCCACTTAC
TACTGTCAACAGAGCTACAGTACGCCTCTCACGTTTGGCGGTGGGACAAAGGTGGAAATCAAAC
GGGCTGATGCTGCACCGACTGTGTCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT
GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGA
TGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACC
TACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCT
GTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

(SEQ ID NO: 33)

Cadena ligera quimérica de r84/PGN311 (secuencia de aminoácidos)

DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNF
YPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV
KSFNRNEC

(SEQ ID NO: 34)

Ejemplo 7: EJ173-112-C11 (r84/PGN311) Inhibe Efectos Mediados por VEGFR2

A. r84/PGN311 Inhibe la Señalización Celular vía VEGFR2

Se usaron ensayos celulares para confirmar el desempeño celular del anticuerpo seleccionado. VEGF simula la señalización intracelular a través de la ruta de MAPK-cinasa, que también comprende la activación (a través de la fosforilación) de dos proteínas llamadas MAPK1 y MAPK2, a 44 y 42 kilo Daltones, respectivamente. Otro nombre para estas proteínas es Erk 1 y Erk2. Los anticuerpos que inhiben la interacción de VEGF con VEGFR2 pueden inhibir también la activación de Erk1/2.

Las líneas de células bEnd.3 o PAE/KDR (obtenidas de Dr. Philip Thorpe at UT-Southwestern Medical Center, Dallas, TX y Dr. Johannes Waltenberger, Ulm University Medical Center, Ulm, Alemania, respectivamente) expresan VEGFR2 en su superficie, permitiéndoles ser estimuladas con

VEGF. Las líneas celulares se ayunaron 48 horas para suero y factores de crecimiento, y luego se estimularon a través de la adición de 10 (V10) y 50 ng/ml de VEGF165 (V50) en la presencia o ausencia del candidato en el formato IgG a 4 µg/ml. Las células no estimuladas fueron el control negativo (NS). Después de esta estimulación, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo que contiene diferentes inhibidores de fosfatasa antes de que se lisaran. El extracto celular centrifugado se corrió en un gel de poliacrilamida, y las proteínas separadas se transfirieron de manera subsiguiente a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se sondeó con un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 para monitorizar la inhibición de la fosforilación de Erk1/2 (Figura 6). También se detectó Erk1/2 total como un control interno de los niveles celulares. El clon tipo IgG de r84/PGN311 inhibió la fosforilación de Erk1/2.

El VEGF también estimula la señalización intracelular a través de la ruta de fosfolipasa Cγ (PLC-γ), que comprende la activación (a través de la fosforilación) de una proteína a 155 kilo Daltones. Los anticuerpos que inhiben la interacción de VEGF con VEGFR2 pueden inhibir también la activación de PLC-γ.

Las líneas de células endoteliales microvasculares, dérmicas, humanas (HDMEC, Lonza, catálogo #CC2810) expresan VEGFR2 en su superficie permitiéndoles ser estimuladas con VEGF. Se colocaron en placa HDMEC a 250,000 células por concavidad usando placas de 6 concavidades. Se dejó que las células se adhirieran

durante la noche en ECM (medio de células endoteliales) con FBS al 5%. Las células entonces se agotaron en suero durante 24 horas y se estimularon a través de la adición de 50 ng/ml de VEGF165 (+VEGF) en la presencia de los anticuerpos Avastin (bevacizumab, Presta et al., 1997), r84/PGN311, 2C3 (todos en formato IgG) o un anticuerpo IgG de control (Synagis (palivizumab), anti-RSV humano, MedImmune). Las IgG se usaron a 90 µg/ml. Las células no estimuladas fueron el control negativo (NT). También se adicionaron Avastin y r84/PGN311 a las células en la ausencia de VEGF.

Después de esta estimulación, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo que contiene diferentes inhibidores de fosfatasa antes de que se lisaran. El extracto celular centrifugado se corrió en un gel de poliacrilamida, y las proteínas separadas se transfirieron de manera subsiguiente a una membrana de nitrocelulosa. Las transferencias se sondearon con un anticuerpo anti-fosfo-pERK1/2) (Figura 16A, pPLC-γ) y anticuerpo anti-fosfo-PLC-γ (Figura 16A, pPLC-γ) para monitorizar la incubación de la fosforilación. También se detectaron ERK1/2 total (Figura 16A), Erk1/2) y PLC-γ (Figura 16A, PLC-γ) como un control interno de los niveles celulares. La expresión de VEGFR2 en las HDMEC se detectó con un anticuerpo a VEGFR2 (Figura 16A). La Figura 16A muestra que el anticuerpo tipo IgG r84/PGN311 inhibió la fosforilación tanto de Erk1/2 como PLC-γ.

Usando la misma metodología como se describe anteriormente, se trataron células PAE Flt1 que expresan

VEGFR1 y se ayunaron de la misma manera antes de que se dejaran sin tratar o que se estimularan a través de la adición de 50 ng/ml de VEGF165 en la presencia o ausencia de los anticuerpos, Avastin o r84/PGN311 (en formato IgG). Las transferencia se prepararon y se sondearon con un anticuerpo anti-fosfo-VEGFR1 (Figura 16B, fosfo-VEGFR1). También se detectó el VEGFR1 total (Figura 16B, VEGFR1 total) como un control interno de los niveles celulares. Los datos en la Figura 16B muestran que r84/PGN311 no inhibe la fosforilación de VEGFR1, en tanto que el control positivo, Avastin, inhibe la fosforilación de VEGFR1. Conjuntamente, la Figura 16A y la Figura 16B confirman que r84/PGN311 bloquea selectivamente la ruta de VEGFR2.

B. r84/PGN311 Bloquea la Migración Inducida por VEGF de Células que Expresan VEGFR2

Como se espera, también se confirmó que r84/PGN311 es capaz de inhibir potencialmente la migración inducida por VEGF de células endoteliales que expresan VEGFR2. Los ejemplos de esta actividad se muestran en la Figura 20A para HDMEC, y en la Figura 20B para células que expresan PAE-KDR. En cada uno de estos ensayos, se señalará que r84 inhibe de manera significativa la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR2 y se desempeña al menos tan bien como Avastin.

Los estudios comparativos usando células PAE Flt1 que expresan VEGFR1 mostraron que r84 no inhibe la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR1 (Figura 21). En contraste, Avastin inhibe

significativamente la migración inducida por VEGF de células que expresan VEGFR1 (Figura 21).

Ejemplo 8: EJ173/112-CI1 (r84/PGN311) se une a VEGF121

Se determinó la unión de EJ173/112-Cl1 (r84/PGN311) scFv a una isoforma biológicamente activa de VEGF-A, VEGF121, (R&D Systems HuVEGF121 298-VS-005/CF). Se colocaron en inmunoplacas de poliestireno 2 µg/ml de VEGF1 libre de portador. Se adicionaron 10 µg/ml de scFv purificado y se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-marca c-myc (Invitrogen) y anticuerpo anti-ratón de conejo, secundario, conjugado a HRP.

Los resultados mostraron que EJ173/112-Cl1 (r84/PGN311) (Figura 7) fue positivo para VEGF121. El control de scFv murino B9 reconoció VEGF121, pero a un menor nivel que las variantes humanas.

Ejemplo 9: EJ173/112-CI1 (r84/PGN311) bloque la unión de VEGF a VEGFR2 pero no a VEGFR1

Se revistieron placas de ELISA con 96 concavidades (BD Falcon, cat # 353279) durante la noche a 4°C con HuVEGFR1/Fc soluble (R&D Systems, cat # 321-FL-050, CF) o HuVEGFR2 (R&D Systems 357-KD-050/CF) a una concentración de 1.0 µg/ml en 50 µl de amortiguador sensibilizador/concavidad. Las concavidades se lavaron en amortiguador de lavado (WB) (TBSt (solución salida amortiguada con Tris, Tween 20 al 0.1%)) y se bloquearon durante 1 hora a 37°C en Aquablock al 20% (East Coast Biologies, Inc.) en WB. Se adicionaron 50 µl de IgG a la concentración apropiada o WB a las concavidades seguido inmediatamente por VEGF-biotina a una concentración final

de 100 ng/ml. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavó 3x y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl/concavidad de avidina conjugada a peroxidasa (Jacksonlmmuno Research) a una dilución 1:7500 en WB. Después del lavado de las placas 4x, se reveló la seña con TMB, se detuvo con ácido y se leyó a 450 nM.

Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 8 A y en la Figura 8B. La señal de VEGF solo (VEGF) o VEGF en la presencia del anticuerpo indicado se normilizó a VEGF solo (100%). Se muestra la media +/- SEM. N=12 (4 placas idénticas con cada tratamiento realizado en triplicados). Una señal de menos de 50% se considera inhibición significativa de la unión.

Como se muestra en la Figura 8A y en la Figura 8B, los resultados de este estudio controlado muestran que r84/PGN311 bloquea sustancialmente la interacción de VEGF con VEGFR2, pero no bloquea sustancialmente la interacción de VEGF con VEGFR1. Los estudios paralelos que usan r84/PGN311 y Avastin (bevacizumab) (Presta et al., 1997) confirmaron las propiedades conocidas de Avastin como que bloquea sustancialmente la interacción de VEGF tanto con VEGFR2 y VEGFR1. Además, los estudios paralelos que usan r84/PGN311 y el anticuerpo 2C3 murino original mostraron que la diferencial en el bloqueo sustancial de la unión de VEGF a VEGFR2, pero no el bloqueo sustancial de la unión de VEGF a VEGFR1, fue aún mayor para r84 que para 2C3. Esto muestra otra ventaja sorprendente de r84 con respecto al anticuerpo 2C3.

Ejemplo 10: Macrófagos Asociados a Tumor Expresan VEGFR2

A. Modelo

Se establecieron tumores ortotópicos en ratones desnudos atímicos (7-9 semanas) al inyectar 1x10'' células MiaPaCa-2 en la extremidad del páncreas. Se dejó que los tumores se desarrollaron durante una semana antes de iniciar la terapia.

B. Tratamiento

Se trataron animales con anticuerpo de control (C44), o el anticuerpo 2C3 murino mediante inyección i.p. dos veces por semana durante tres semanas. El sacrificio, se escindieron los tumores y con el páncreas residual, se pesaron y se congelaron instantáneamente o se fijaron en caraoys de metilo para análisis histoquímico e inmunohistoquímico.

C. IHC

Los anticuerpos usados para marcadores de macrófago incluyen CD86, CD14 y F4/80. Se usaron los anticuerpos T0 14 y RAFL-2 de VEGFR2.

D. Aislamiento de Macrófagos Peritoneales

Por lavado peritoneal estéril se aislaron macrófagos de animales que tienen tumor (TB) o que no tienen tumor (NTB).

E. Resultados

De manera sorprendente, se encontró que los macrófagos asociados a tumor (TAM) expresaron VEGFR2. Esto explica la observación que 2C3 redujo la infiltración de TAM positivos a VEGFR2 *in vivo*. Los resultados se muestran en las figuras 10A, 10B y 10C.

A este respecto, la Figura 10A representa la co-localización de la tinción de T014 (anticuerpo VEGFR2) y F4/80 (marcador de macrófago) en secciones tumorales de animales tratado con control o tratados con 2C3. 2C3 disminuye la infiltración de macrófagos. Sin embargo, ambos grupos demuestran la co-localización de VEGFR2 y marcadores de macrófago. El número de células doblemente positivas para uno de los tres diferentes marcadores de macrófagos y VEGFR2 se representa en la Figura 10B. En la Figura 10C, los macrófagos peritoneales de animales que tienen tumor demuestran VEGFR2 usando dos anticuerpos diferentes.

Ejemplo 11: r84/PGN311 Disminuye el Volumen Tumoral en Animales

Se usaron modelos de animal para mostrar que la administración del anticuerpo r84/PGN311 conduce a una reducción significativa en los volúmenes tumorales.

A. Modelo de Tumor de Células de Cáncer de Mama MDA-MB-231

Se inyectaron 5 millones de células MDA-MB-231 en la almohadilla grasa mamaria de ratones SCID. Los tumores se desarrollaron durante 26 días antes del inicio de la terapia. En este momento, los animales se asignaron al azar a los grupos de tratamiento. Se dieron 100 µl de solución salina (control, n=5) o 250 µg en 100 µl de amortiguador de Avastin IgG (n=8) o r84/PGN311 IgG (n=9) por inyección subcutánea 2 veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 11, que presenta el volumen tumoral medio positivo/negativo +/- SEM. Los ratones tratados con Avastin y r84 tienen volúmenes tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratados con el control. La

Figura 12 presenta el peso tumoral/peso corporal para animales individuales en cada grupo de tratamiento. Los ratones tratados con Avastin y r84 tienen relaciones de tumor/cuerpo que son significativamente más pequeñas que los animales tratados con control. Los resultados en la Figura 11 y en la Figura 12 muestran que r84 se desempeña esencialmente tan efectivo como Avastin.

B. Modelo de Tumor de Rabdomiosarcoma A673

Se inyectaron 1.0 x $10^6$ células A-673 (una línea de células de rabdomiosarcoma humano ATCC CRL-1598) subcutáneamente en 22 ratones nu/nu (NCI). Los ratones se dividieron en 3 grupos (n=8/grupo para 2C3 y r84/PGN311, n=6/grupo de control) y se inició la terapia 5 días después de la inyección de células tumorales (TCI). La terapia consistió de 50 µg de la IgG inyectada ip 2x/semana. Se monitorizó el volumen tumoral y el peso del animal. El anticuerpo de control fue Synagis (anti-RSV humano).

Los ratones recibieron 8 inyecciones de terapia entre el día 5 el día 29 después de TCI. La Figura 13 muestra el volumen tumoral de cada grupo en el día 3 después de TCI. El ANOVA unidireccional indica que los grupos son estadísticamente diferentes; adicionalmente 2C3 y r84/PGN311 son diferentes del control por "Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett" ($p < 0.05$). Es claro de estos resultados que 2C3 y r84 redujeron el crecimiento tumoral a la dosis modesta de 50 µg/inyección 2x/semana. r84 presentó actividad que fue esencialmente la misma como 2C3. La conclusión completa de este estudio animal es que 2C3 y r84 son efectivos en el control del crecimiento de

tumores A673.

C. Modelos de Cáncer Pulmonar Humano de Células no Pequeñas (NSCLC)

Se usaron adicionalmente modelos animales *in vivo* para mostrar que la administración del anticuerpo r84/PGN311 conduce a reducciones significativas en el crecimiento tumoral.

Se probó la capacidad de r84/PGN311 para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* en cuatro diferentes cánceres pulmonares humanos de células no pequeñas (NSCLC), H1299 (ATCC CRL-5803), H460 (ATCC HTB-177), H358 (ATCC CRL-5807) y A549 (ATCC CCL-185). Se inyectaron ratones SCID (n=25 por línea celular) subcutáneamente con $2.5x10^6$ células y se inició la terapia 1 día después de TCI. La terapia consistió de 250 µg de Synagis o XTL (control negativo), IgG de Avastin (control positivo) o 500 µg de r84/PGN311 distribuido intraperitonealmente (i.p.) 2 veces cada semana. La terapia se dio hasta que se sacrificaron los ratones. Los ratones H460 se sacrificaron después de 40 días, los ratones H 1299 se sacrificaron después de 48 días, los ratones A549 se sacrificaron después de 55 días, y los ratones H358 se sacrificaron después de 83 días. Los pesos tumorales se midieron, y los resultados se muestran en la Figura 17A (para H460), Figura 17B (para H1299), Figura 17C (para H358) y Figura 17D (para A549) como peso tumoral medio +/- SEM. Las relaciones de los pesos tumorales tratados con respecto a los pesos tumorales de control también se muestran en la Figura 17A, Figura 17B, Figura 17C y Figura 17D ("T/C").

La Figura 17A, Figura 17B, Figura 17C y Figura 17D muestran que los animales tratados con Avastin y r84/PGN311 tienen pesos tumorales que son significativamente más pequeños que los animales tratado con control. r84/PGN311 se desempeña mejor que Avastin en los modelos de H460 (Figura 17A), H1299 (Figura 17B) y A549 (Figura 17D). r84/PGN311 se desempeña al menos efectivamente como Avastin en el ensayo H358 (Figura 17C).

D. Modelo de Tumor de Células de Cáncer Pancreática Panc1

Ratones que tienen células de adenocarcinoma pancreático, Panc1, se les dio ya sea r84/PGN311 IgG o Synagis como un control negativo. La terapia se dio hasta que se sacrificaron los ratones. Los volúmenes tumorales se midieron y los resultados se muestran en la Figura 22. Se puede ver que r84/PGN311 reduce notablemente el crecimiento tumoral Panc1 en comparación al control (Figura 22).

E. Modelo de Tumor Mamario 4T1

Estudios controlados que usan la versión quimérica de ratón de r84/PGN311 mostraron que el anticuerpo r84 es capaz de prolongar la supervivencia de ratones que tienen tumores mamarios 4T1 singenéicos. Como se muestra en la Figura 23, el tratamiento con r84/PGN311 quimérico de ratón dio por resultado la supervivencia de ratones más tiempo que los animales en el grupo tratado con control.

Ejemplo 12: r84/PGN311 Reduce la Densidad de Microvasos y la Infiltración de Macrófagos Asociados a Tumor

Se tomaron tumores de ratones usados en el estudio de modelo de animal MDA-MB-231 descrito en el

Ejemplo 11 y también de ratones que se han tratado en paralelo de acuerdo con el mismo régimen con 250 µg en 100 µl de amortiguador de 2C3 IgG. Estos tumores se seccionaron y tiñeron con los anticuerpos a células endoteliales de ratón (MECA-32) y a un marcador de macrófagos (Mac-3). Se analizaron tres tumores de animales de control y tres tumores cada uno de animales tratados con r84/PGN311 2C3 y se estudiaron 5 imágenes de cada tumor. Los resultados se muestran en la Figura 14 y en la Figura 15, que muestran que los tumores de los animales tratados con r84 y 2C3 mostraron un número significativamente reducido de vasos sanguíneos/campo de alta potencia (MECA-32, $p<0.0001$, Figura 15) y expresión significativamente reducida del marcador de macrófagos (Mac-3, $p<0.01$ para r84, Figura 14). Esto es evidencia que r84 reduce significativamente la densidad de microvasos y la infiltración de macrófagos asociados a tumor y que r84 tiene un efecto más pronunciado que 2C3 en la reducción de la infiltración de macrófagos asociados a tumor (Figura 14).

Ejemplo 13: Efectos de r84/PGN311 en Células que Infiltran Tumores

A. Leucocitos Polimorfonucleares

Se tomaron tumores de los ratones usados en el estudio de modelo de animal MDA-MB-231 descrito en el Ejemplo 11 y también de ratones que se han tratado en paralelo de acuerdo con el mismo régimen con 250 µg en 100 µl de amortiguador de 2C3 IgG. El estudio ha mostrado que los tumores de animales tratados con r84 y 2C3 tienen infiltración significativamente incrementada de leucocitos

polimorfonucleares (PMN) en comparación al control. Este efecto fue estadísticamente significativo para los anticuerpos r84 y 2C3. Aunque Avastin (bevacizumab) también incrementó la infiltración de PMN en tumores MDA-MB-231 en comparación al control, en contraste a r84 y 2C3, este incremento no fue estadísticamente significativo para Avastin.

B. Células CD11b+/Gr1+

Los estudios adicionales en ratones que tienen tumores MDA-MB-231 han mostrado que significativamente menos células doblemente positivas CD11b/Gr1 infiltran los tumores en animales tratados con r84 como lo opuesto al control. En estudios comparativos, ni el anticuerpo 2C3 ni Avastin mostraron una disminución estadísticamente significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+, aunque fue medible alguna reducción en los animales tratados con Avastin.

Se tomaron tumores de los ratones usados en el estudio de modelo de animal MDA-MB-231 descrito en el Ejemplo 11 y también de ratones que se han tratado en paralelo de acuerdo con el mismo régimen con 250 µg en 100 µl de amortiguador 2C3 IgG.

El estudio ha mostrado que significativamente menos células doblemente positivas a CD11b+/Gr1+ infiltran los tumores en animales tratados con r84 como lo opuesto al control (como se valor por ANOVA, $p<0.01$, mostrado por ** en la Figura 25). La disminución en el número de células doblemente positivas fue de 39%. En estudios comparativos, 2C3 no muestra una disminución estadísticamente

significativa en la infiltración de CD11b+/Gr1+ (Figura 25).

La infiltración reducida de células supresoras derivadas mieloides CD11b+/Gr1+ es de interés especial, puesto que las células que expresan ambos marcadores se han asociado recientemente con la mediación de la capacidad de refracción tumoral a la terapia anti-VEGF (Shojaei et al., 2007). Las células supresoras derivadas de mieloide (CD11b+Gr1+) también son un contribuyente importante al progreso tumoral. En el microambiente tumoral estas células segregan mediadores inmunosupresores e inducen la disfunción de linfocitos T (Gabrilovich et al., 2001; Serafini et al., 2004).

Puesto que la infiltración tumoral de células CD11b+/Gr1+ es menos pronunciada aislar significativamente menor en animales tratados con r84, se sugiere que el tratamiento con r84 es menos propenso al desarrollo de resistencia a fármaco o capacidad de refracción a la terapia anti-VEGF que el tratamiento con otros fármaco que seleccionan como objetivo VEGF.

Esta capacidad para reducir la infiltración de células CD11b+/Gr1+ en tumores de esta manera es una propiedad ventajosa adicional mostrada por el anticuerpo r84/PGN311 y es una propiedad que tiene una importancia potencial para aplicaciones terapéuticas de r84/PGN311. Adicionalmente, esta propiedad no se muestra por el anticuerpo 2C3 y solo a un nivel más reducido por Avastin.

Ejemplo 14: r84/PGN311 Reduce Densidad Linfática en Tumores

Se trataron con r84/PGN311 ratones con tumores

MDA-MB-231 o con el anticuerpo de control y se analizaron secciones tumorales para mostrar los vasos linfáticos dentro de los tumores. Los resultados se presentan en las Figuras 18A(a)-18C, que muestran que la densidad de vasos linfáticos en tumores tratados con r84 es significativamente menor que en los tumores de control.

En particular, se realizó primero la tinción de inmunofluorescencia de secciones tumorales MDA-MB-231 congeladas para identificar vasos linfáticos mediante los marcadores linfáticos, podoplanina y Prox1. Estos resultados se exponen en las Figuras 18A(a)-18A(f), que muestra podoplanina (verde), Prox1 (rojo) e imágenes fusionadas, e identificando de este modo los vasos linfáticos en tumores de control (figura 18A(a)) y tratados con r84 (figura 18A(b)). También se realizó la tinción de LYVE-1 en secciones tumorales consecutivas MDA-MB-231. Como se muestra en las Figuras 18B(a)-18B(b), estos resultados indican que el patrón de los vasos linfáticos en secciones tumorales MDA-MB-231 teñidas para LYVE-1 es similar a aquel observado para podoplanina y Prox1 (Figuras 18A(a)-18A(f)).

Para determinar si la densidad de los vasos linfáticos en tumores de control y tratados con r84 fue diferente, se examinó el área completa de cada sección tumoral teñida con LYVE-1 a un bajo aumento y se determinó el por ciento de área positiva LYVE-1 para cada campo usando software de información de imágenes NIS. Los diez campos con el más con el área de por ciento más alto positiva LYVE-1 se promediaron conjuntamente para producir una puntuación final para cada tumor y media de grupo se

probó para significado por una prueba t de student no apareada. Como se representa en la Figura 18C, el por ciento del área positiva LYVE-1 de los tumores de control (7.03 ± 1.013; n = 6) fue significativamente mayor que los tumores tratados con r84 (2.23 ± 0.986; n = 5), con P = 0.0042. Estos resultados, que muestran el tratamiento con r84/PGN311 disminuyó significativamente la densidad de vasos linfáticos tumorales, de esta manera soporta el uso de los anticuerpos humanos de la invención para inhibir la linfaangiogénesis.

Ejemplo 15: Administración Crónica de r84/PGN311 no induce toxicidad en ratones

Se usaron en sus estudios ratones que no tienen tumor y que tienen tumor.

Se inyectaron $5x10^6$ células Panc-1 (línea de células de cáncer pancreático humano, ATCC CRL-1469), en 10 ratones SCID. En el día 1 después de TCI, se inyectaron 5 ratones que tienen tumor y 5 ratones que no tienen tumor i.p. con 500 µg de Synagis o r84/PGN311 IgG. Se dio la terapia por inyección 2 veces por semana y se continuó durante 12 semanas después de lo cual se sacrificaron los ratones. En el momento del sacrifico, se tomó y analizó sangre para química sanguínea normal. El hígado, riñón y tiroides también se recolectaron para evaluación histológica.

Estos análisis mostraron que no hubo cambios aparentes en la histología de cualquier tejido examinado por tinción de H&E (este examen se llevó a cabo de una manera sin testigo por un patólogo quien se especializa en

histología de tejido de ratón). Adicionalmente, se analizó la química sanguínea para 22 diferentes analitos y no se encontraron cambios significativos entre los ratones de control sin tratamiento previo, o los animales tratado con r84.

En tanto que las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de modalidades preferidas, será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a la composición, métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos de los métodos descritos en la presente sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. De manera más específica, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados se pueden sustituir por los agentes descritos en la presente en tanto que se lograrán los mismos o similares resultados. Todos estos sustitutos y modificaciones similares aparentes por los expertos en la técnica se juzgan que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones anexas.

Referencias

Las siguientes referencias, al grado que proporcionan detalles de procedimientos de ejemplos y otros complementarios a los expuestos en la presente, se incorporan en la presente como referencia.

Abrams y Oldham, "In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer", Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 103-120, 1985.

Aiello, Pierce, Foley, Takagi, Chen, Riddle,

Ferrara, King, Smith, "Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins," Proc. Nati. Acad. Sci., USA, 92:10457-10461, 1995.

Alderson, McGowan, Baldridge, Probst, "TLR4 Agonists as Immunomodulatory Agents", J. Endoxin Res., 12(5):313-319, 2006.Alon, Hemo, Itin, Pe'er, Stone, Keshet, Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity," Nature Med,1:1024- 1028, 1995.

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI- BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997.

Anthony, Wheeler, Elcock, Pickett, Thomas, "Short report: identification of a specific pattem of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts", Placenta, 15:557-61, 1994.

Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, Ortiz, Criollo, Mignot, Maiuri, Ulhich, Satilnier, Yang, Amigorena, Ryffel, Barrat, Saftig, Levi, Lidereau, Nogues, Mira, Chompret, Joulin, Clavel-Chapelon, Bourhis, Andre, Delaloge, Tursz, Kroemer, Zitvogel, "Toll-Like Receptor 4-Dependent Contribution of the Immune System to Anficancer Chemotherapy and Radiotherapy", Nat. Med., 13:1050-1059, 2007.

Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", FEBS Lett., 414:521-526, 1997.

Asahara, Murohara, Sullivan, Silver, van der Zee, Li, Witzenbichler, Schatteman, Isner, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," Science, 275(5302):964-967, 1997.

Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor gfowth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," Cancer Res., 55:5296-5301, 1995.

Asano, Yukita, Matsumoto, Hanatani, Suzuki, "An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity *in vivo," Hybridoma,* 17:185-90, 1998.

Baca, Presta, O'Connor, Wells, "Antibody humanization using monovalent phage display, " *J. Biol. Chem.,* 272(16):10678-84, 1997.

Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in Saccharomyces Cerevisiae", *EMBO J,* 6:229-234, 1987.

Barbas, Kang, Lerner y Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad.. Sci. USA,* 88(18):7978-7982, 1991.

Baxter y Jain, "Transport of fluid and

macromolecules in tumors," *Micro. Res.*, 41:5-23, 1991. –

Beckman, Weiner y Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", *Cancer,* 109(2):170-179, 2006.

Benjamin, Golijanin, Itin, Pode y Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *J. Glim Invest.*, 103 (2):159-165, 1999.

Berman, Mellis, Pollook, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO* 7(3):727-738, 1988.

Borgstrom, Hillan, Sriramarao, Ferrara, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti- vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.

Borgstrom Bourdon, Hillan, Sriramarao, Ferrara, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo," Prostate,* 35(1):1-10, 1998.

Borgstrom, Gold, Hillan, Ferrara, "Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin," *Anticancer Research,* 19(5B):4203-11, 1999.

Bornstein, "Thrombospondins structure and regulation of expression,".FASEB *J,* 6(14):3290-3299, 1992.

Brekken, Huang, King, Thorpe, "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium," *Cancer Res.,* 58(9):1952-1959, 1998.

Brekken, Overholser, Stasny, Waltenberger, Minna, Thorpe, "Selective inhibition of VEGFR2 activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice", *Cancer Res.,* 60:5117-24, 2000.

Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis,* 2: 920, 1998.

Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", *Proc. Nati. Acad. Sci. USA,* 82(13):4438-4442, 1985.

Burke, Carle, Olson, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", *Science,* 236, 806-812, 1987.

Burke, Lehmann-Bruinsma, Powell, "Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury," *Biochem. Biophys. Res. Comm.,* 207:348-354, 1995.

Burrows y Thorpe, "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors," *Pharmacol. Ther.,* 64:155-174, 1994.

Burrows y Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Nati. Acad. Sci. USA,* 90:8996-9000, 1993.

Burrows, Watanabe, Thoipe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.

Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoeck, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," *Nature,* 380(6573):435-439, 1996.

Carillo y Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", *SIAMJ. Applied Math.*, 48:1073, 1988.

Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Nati. Acad. Sci. USA,* 93:8502-8507, 1996.

Claffey, Brown, del Aguila, Tognazzi, Yeo, Manseau, Dvorak, "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis," *Cancer Res.*, 56:172- 181, 1996.

Clapp, Martial, Guzman, Fentier-Delure, Weiner, "The 16-Icilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology,* 133(3):1292-1299, 1993.

Clauss, Weich, Breier, Knies, Riickl, Waltenberger, Risau, "The vascular endothelial cell growth factor receptor Fit-1 mediates biological activities," *J. Biol. Chem.*, 271(30):17629-17634, 1996.

Cohen, Gaskins, Nasoff, "Generation of a Monoclonal Antibody Agonist to Toll-Like Receptor 4", *Hybridoma,* 24(1):27-35, 2005.

Condeelis y Pollard, "Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis", *Cell,* 124:263-266, 2006.

Connolly, Heuvelman, Nelson, Olander, Eppley, Delfino, Siegel, Leimgruber, Feder, "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis," *J. Clin: Invest.,* 84:1470-1478, 1989.

Coughlin, Salhany, Wysocka, Aruga, Kurzawa, Chang, Hunter, Fox, Trinchieri, Lee, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.,* 101(6):1441-1452, 1998.

Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretión of Bovine Chymosin in Aspergillus Nidulans", *BioTechnology,* 5:369, 1987.

D'Amato, Loughnan, Flynn, Follcman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 91(9):4082-4085, 1994.

D'Angelo, Struman, Martial, Weiner, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N- terminal fragment of prolactin," *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 92(14):6374-6378,

1995.

Davies y Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," *Proc Nat!. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7-12, 1996.Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473, 1990.

Davies y Riechmarm, "Antibody VH domains as small recognition units", *Biotechnology (N19,* 13:475-479, 1995.

Davis y Yancopoulos, "The angiopoietins. Yin and Yang in angiogenesis", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 237:173-85, 1999.

Detmar, Brown, Claffey, Yeo, Kocher, Jackman, Berse, Dvorak, "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis," *J. Lip. Med.,* 180:1141-1146, 1994.

Devereux, Haeberli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.,* 12:387, 1984.

DeVore, Hellerqvist, Wakefield, Wamil, Thunnan, Minton, Sundell, Yan, Carter, Wang, York, Zhang, Johnson, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Cancer Res.,* 3(3):365-372, 1997.

deVries, Escobedo, Ueno, Houck, Fen-ara, Williams, "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor," *Science,* 255(5047):989-991, 1992.

Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells,* 3:77-85, 1991a.

Dvorak, Sioussat, Brown, Berse, Nagy, Sotrel,

Manseau, Vandewater, Senger, "Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors - concentration in tumor blood vessels," *J. Exp. Med.*,174:1275-1278, 1991b.

Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat,* 36:127-137, 1995.

Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulatecl growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology,* 129(2):896-900, 1991.

Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *J. Cell. Biochem.,* 47:211-218, 1991.

Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea., Powell-Braxton, Hillan, Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene," *Nature,* 380(6573):439-442, 1996.

Fidler y Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [comment]," *Cell,* 79(2):185-188, 1994.

Fidler, Kumar, Bielenberg, Ellis, "Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis," *Cancer J. Sci. Am.,* 4 Suppl 1:S58-66, 1998.

Finberg, Knipe, Kurt-Jones, "Herpes Simplex Virus and Toll-Like Receptors", *Viral Immunol.,* 18(3):457-465, 2005.

Follcman y Shing, "Angiogenesis," 1 *Biol. Chem.,* 267:10931-10934, 1992.

Follcman, Langer, Linhardt, Haudenschild, Taylor, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science,* 221:719-725, 1983.

Fong, Rossant, Gertsenstein, Breitman, "Role of the Fit-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium," *Nature,* 376:66-70, 1995.

Forsythe, Jiang, Iyer, Agani, Leung, Koos, Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Mol. Cell. Biol.,* 16:4604-4613, 1996.

Fotsis, Zhang, Pepper, Adlercreutz, Montesano, Nawroth, Schweigerer, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature,* 368(6468):237-239, 1994.

Frank, Hubner, Breier, Longaker, Greenhalgh, Werner, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," *J. BioL Chem.,* 270:12607-12613, 1995.

Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992.

Frater-Schroder, Risau, Hallmann, Gautschi, Bohlen, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro,* is angiogenic *in vivo," Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 84(15):5277-5281, 1987.

Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell BioL* , 3(5):792-799, 1991.

Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column

Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", *J. Pept. Sci.*, 2(4): 212-22, 1996.

Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. & Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol,* 166, 5398-406.

Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.,* 52(18):5073-5075, 1992.

Gagliardi y Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.,* 53(3):533-535, 1993.

Gagliardi, Kassack, Kreimeyer, Muller, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. PharmacoL,* 41(2):117-124, 1998.

Gagnon, Bielenberg, Gechtman, Miao, Takashima, Soker, Klagsbrun, "Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *In vivo* expression and antitumor activity", *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 97(6):2573-2578, 2000.

Gerber, Condorelli, Park, Ferrara, "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes," *J. BioL Chem.,* 272:23659-,23667, 1997.

Gerber, Vu, Ryan, Kowalski, Werb, Ferrara, "VEGF

couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation"; *Nature Medicine,* 5(6):623-8, 1999.

Giovarelli, Cappello, Forni, Salcedo, Moore, LeFleur, Nardelli, Di Carlo,Lollini, Ruben, Ullrich, Garotta, Musiam, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes; and granulocytes", *J. Immunol.,* 164, 3200-3206, 2000.

Glennie, McBride, Worth, Stevenson, "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments," *J. Immunol.,* 139:2367-2375, 1987.

Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic *Press, San Diego, CA,* 1990.

Good, Polverini, Rastinejad, Beau, Lemons, Frazier, Bouck, "A tumor suppressor- dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87(17):6624-6628, 1990.

Goswami, Sahai, Wyckoff, Cammer, Cox, Pizley, Stanley, Segall y Condeelis, "Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop", *Cancer Res.,* 65(12):5278-5283, 2005.

Grant, Caballero, Bush, Spoerri, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes,* 47(8):1335-1340, 1998.

Guo, Jia, Song, Warren, Donner, "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains," *J. BioL Chem.*, 270:6729-6733, 1995.

Hamers-Casterman y Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature,* 363(6428):446-448, 1993.

Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature,* 315:680-683, 1985.

Hanahan y Follanan, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell,* 86(3):353-364, 1996.

Harada, Mitsuyama, Yoshida, Sakisaka, Taniguchi, Kawaguchi, Ariyoshi, Saiki, Sakamoto, Nagata, Sata, Matsuo, Tanikawa, "Vascular endothelial growth factor in patients •with rheumatoid arthritis", *Scandinavian J. RheumatoL,* 27(5):377-80, 1998.

Haran, Maretzek, Goldberg, Horowitz, Degani, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.,* 54(21):5511-5514, 1994.

Hasselaar y Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.,* 49(3):272-283, 1992.

Harlow y Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", *Gold Spring Harbor Laboratory,*

Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 978-087969314-5 :1-726, 1988.

Hellerqvist, Thurman, Page, Wang, Russell, Montgomery, Sundell, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Gun. Oncol.,* 120(1-2):63-70, 1993.

Henikoff y Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 89:10915-10919, 1992.

Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", *Proc. Nati. Acad. Sci. USA,* 75:1929, 1978.

Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, Shibuya, "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice," *Proc. Nati. Acad. Sci. USA,* 95(16):9349-9354, 1998.

Hiscox y iiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo,11(2):125-* 132, 1997.

Holash, Maisonpierre, Compton, Boland, Alexander, Zagzag, Yancopoulos, Wiegand, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", *Science,* 284:1994-1998, 1999.

Holliger y Hudson, "Engineeied Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", *Nature· Biotechnology,* 23(9):1126-1136, 2005.

Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", *Trends in Biochemical Sciences,* 20:478-480, 1995.

Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment

of Distance Matrices", *J. Mol. BioL,* 233:123-38, 1993

Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", *Nucleic Acid Res.,* 26:316-9, 1998.

Hood y Granger, "Protein kinase G, mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human enelothelial cells," *J. BioL Chem.,* 273(36):23504-23508, 1998.

Hood, Meininger, Ziche, Granger, "VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells," *Am. J. PhysioL,* 274(3 Pt 2):H1054-1058, 1998.

Hori, Hu, Yasui, Smither, Gresham, Fan, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. PharmacoL, 118(7):1584-1591,* 1996.

Horsmans, Berg, Desager, Mueller, Schott, Fletcher, Steffy, Bauman, Ken, Averett, "Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection," Hepatology, 42(3):724-31, 2005.Houben-weyl, *Methods of Organic Chemistry'* , ed. E. Wansch, Vol. 15 I and II, Thieme, Stuttgart, 1987.

Houck, Ferrara, Winer, Cachianes, Li, Leung, "The vascular endothelial growth factor farnily: Identification of a fourth molecular species and characterization of altemative splicing of RNA," *Mol. EndocrinoL,* 5(12):1806-1814, 1991.

Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science,* 275:547-550,

1997.

Hurwitz, Fehrenbacher, Novotny, Cartwright, Hainsworth, Heim,'Berlin, Baron, Griffing, Holmgren, Ferrara, Fyfe, Rogers, Ross, Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer", N *Eng!. J. Med.,* 350:2335-2342, 2004.

Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic y Lerner, "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda, *Science,* 246(4935):1275-1281, 1989.

Hussain, Kotz, Minasian, Premkumar, Sarosy, Reed, Zhai, Steinberg, Raggio, Oliver, Figg, Kohn, "Phase II Trial of Carboxyamidotriazole in Patients With Relapsed Epithelial Ovarian Cancer", *J. Clin. OncoL,* 21(23):4356-4363, 2003.

Ingber, Fujita, Kishimoto, Sudo, Kanamaru, Brem, Folkman, "Angioinhibins: Synthetic analogues of furnagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature,* 48:555-557, 1990;

Inoue, Itoh, Ueda, Naruko, Kojima, Komatsu, Doi, Ogawa, Tamura, Takaya, Igaki, Yamashita, Chun, Masatsugu, Becker, Nakao, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", *Circulation,* 98(20):2108-16, 1998.

Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations",J. *BacterioL,* 153:163-168, 1983.

Iwamoto, Nomizu, Yamada, Ito, Tanaka, Sugioka, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer,* 73(5):589-595, 1996.

Jackson, Volpert, Bouck, Linzer, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science,* 266(5190):1581-1584, 1994.

Jendraschak y Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer BioL,* 7(3):139-146, 1996.

Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", *5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD,* 647- 669, 1991.

Kamphaus, Colorado, Panka, Hopfer, Ramchandran, Torre, Maeshima, Mier, Sukhatme, y Kalluri, "Canstatin, a Novel Matrix-derived Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth", *J. Biol. Chem.,* 275(2):1209-1215, 2000.

Kang, Barbas, Janda, Benkovic y Lerner, "Linkage of Recognition and Replication Functions by Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces", *Proc. Nati. Acad. ScL, U.S.A.,* 88(10):4363-4366, 1991.

Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Marnmalian Cells", *EMBO J,* 6:187- 195, 1987.

Kaur, Brat, Devi y Van Meir, "Vasculostatin, a

proteolytic fragment of Brain Angiogenesis Inhibitor,1, is an antiangiogenic and antiturnorigenic factor", *Oncogene,* 24:3632-3642, 2005.

Keck, Hauser, Krivi, Sanzo, Warren, Feder, Connolly, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF," *Science,* 246:1309-1312, 1989.

Kendall y Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Nati. Acad. ScL USA,* 90:10705- 10709, 1993.

Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.,* 64(6):971-978, 1997.

Kerbel, Viloria-Petit, Okada, Rak, "Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis," *Mol. Med.,* 4(5):286-295, 1998.

Keyt, Nguyen, Berleau, Duarte, Park, Chen, Ferrara, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.,* 271(10):5638-46, 1996.

Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors,* 7:53-64, 1992.

Kim, Li, Winer, Arrnanini, Gillett, Phillips,

"Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*," *Nature*, 362:841- 844, 1993.

Kim, Kwak, Atm, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999.

Kipriyanov, Kupriyanova, Little, Moldenhauer, "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry", *J. Immunol. Meth.*, 196:51-62, 1996.

Kipriyanov, Moldenhauer, Little, "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures", *J. Immunol. Meth.*, 200:69-77, 1997.

Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.

Kleinman, Weeks, Schnaper, Kibbey, Yamamura, Grant, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.

Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem.Biophys. Res. Commun*, 194(3):1234-1241, 1993.

Korpelainen y Alitalo, "Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis," *Curr. Opin. Cell BioL*, 10(2):159-164, 1998.

Kremer, Breier, Risau, Plate, "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system," *Cancer Res.*, 57:3852- 3859, 1997.

Kroll y Waltenberger, "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells", *J. BioL Chem.*, 272:32521-7, 1997.

Kroll y Waltenberger, "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells *via* VEGF receptor-2 (KDR)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3):743-746, 1998.

Kurjan y Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MFa): a Putative a-Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature a-Factor", *Cell*, 30:933-943, 1982.

Kyte y Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. BioL*, 157(1):105-132, 1982.

Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," 1 *BioL Chem.*, 267(23):16736-16745, 1992.

Le Gall, Reusch, Little y Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4):357- 366, 2004.

Lee, Clapp, Martial, Weiner, "Inhibition of

urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology,* 139(9):3696-3703, 1998.

Lewis y Pollard, "Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments", *Cancer Res.,* 66(2):605-612, 2006.

Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.,* 9:49-58, 1998.

Lin, Buxton, Acheson, Radziejewslci, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Nat!. Acad. Sci., USA,* 95(15):8829-34, 1998.

Lin, Nguyen, Mendoza, Escandon, Fei, Meng, Modi, "Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor", *J. Pharmacol. Exp. Therap.,* 288(1):371-8, 1999.

Lin, Nguyen, Russell y Pollard, "Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy", *J. Exp. Med.,* 193(6):727-739, 2001.

Lin, Li, Gnatovskiy, Deng, Zhu, Grzesik, Qian, Xue y Pollard, "Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer", *Cancer Res.,* 66(23):11238-11246, 2006.

Lindner y Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor- induced

angiogenesis," *Int. J. Cancer,* 71(3):456-461, 1997.

Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.,* 58(23):5551-5558, 1998.

Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.,* 74(2):476-483, 1996.

Lin-ke, Hong-Qu, Nagy, Eckelhoefer, Masse, Dvorak, Dvorak, "Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor," *Eur. Cancer,* 32A(14):2467-2473, 1996.

Loupakis, Falcone, Masi, Fioravanti, Kerbel, Del Tacca, Bocci "Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Immunodepleted plasma of Cancer Patients As a Possible Pharmacodynamic Marker for Bevacizumab Activity," *J. Clin. Onc,* 1816-1818, 2007.

Luckow y Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Viro/ogy,* 170:31-39,1989.

Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.,* 58(12):2594-2600,1998a.

Luo, Yamaguchi, Shinkai, Shitara, Shibuya, "Significant expression of vascular endothelial growth

factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.,* 58(12):2652-2660,1998b.

Majewski, Skopinska, Marczak, Szmurlo, Bollag, Jablonska "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.,* 1(1):97-101,1996.

Malecaze, Clamens, Simorre-Pinatel, Mathis, Chollet, Favard, Bayard, Plouet, "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy," *Arch. Ophthalmol.,* 112:1476-1482,1994.

Maisonpierre, Suri, Jones, Bartunkova, Wiegand, Radziejewski, Compton, McClain, Aldrich, Papadopoulos, Daly, Davis, Sato, Yancopoulos, "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," *Science,* 277(5322):55-60, 1997.Manetti, Cappello, Botta, Corelli, Mongelli, Biasoli, Borgia, Ciomei, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.,* 6(7):947-958,1998.

Massey, "Catalytic Antibodies Catching On", *Nature,* 328:457-458,1987.

Mazure, Chen, Yeh, Laderoute, Giaccia, "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression," *Cancer Res.,* 56:3436-3440,1996.

McNamara, Harmey, Walsh, Redmond, Bouchier-Hayes, "Significance of angiogenesis in cancer therapy [published

erratum appears in *Br J Surg.*, Oct;85(10):1449,1998," *Br. J. Surg.*, 85(8):1044-1055.1998.

Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154,1964.

Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256,1998.

Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*," *Cancer Res.*, 56:1615-1620,1996.

Mills, Brooker y Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.

Moore, Arenbeig, Addison, Keane, Streiter, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.

Mordenti, Thomsen, Licko, Chen, Meng, Ferrara, "Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans", *Toxicologic Pathology*, 27(1):14-21, 1999.

Morrison, Wims, Kobrin y Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene trans fection, " *Mt. Sinai J Med.*, 53(3):175, 1986.

Muller, Li, Christinger, Wells, Cunningham, De Vos, "Vascular Endothelial growth factor: Crystal structure

and functional mapping of the kinase domain receptor binding site", *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA.*, 94:7192-7197, 1997.

Muller, Chen, Christinger, Li, Cunningham, Lowman, de Vos, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 A resolution and mutational analysis of the interface," *Structure,* 6(9):1153-67, 1998.

Mustonen y Alitalo, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis," *J. Cell Biol.*, 129:895-898, 1995.

Myers y Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS,* 4:11-17, 1988.

Nagashima, Yoshino, Aono, Takai, Sasano, "Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells", Gun. *Exp. Immunol.*, 116(2):360-5, 1999.

Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.

Nalcamura Voller y Bidwell, "Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems",/n: *Handbook of Experimental Immunology,* Vol. 1: Immunochemistry, D.M. Weir (Ed.), Blackvvell Scientific Publications, Oxford 1986, Chapter 27.

Needleman y Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.

Neuberger y Milstein, "Somatic hypermutation," *Curr. Opin. Immunol.,* 7:248-254, 1995.

Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FASEB J,* 13(1):9-22, 1999.

Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunogl obul in scaffold", *Protein Sci.,13* : 1882-1891, 2004.

Niida, Kaku, Amano, Yoshida, Kataoka, Nishikawa, Tanne, Maeda, Nishikawa, Kodama,"Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption", *J. Exp. Med.,* 190(2):293-8, 1999.

Nozaki, Sakurai, Raisler, Baffi, Witta, Ogura, Brekken, Sage, Ambati, Ambati, "Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A", *J. Clin. Invest.,* 116(2):422-9, 2006.

Oikawa, Hirotani, Nakamura, Shudo, Hiragun, Iwaguchi, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.,* 48(2):157-162, 1989.

Olander, Connolly, DeLarco, "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.,* 175:68-76, 1991.

O'Reilly, Holmgren, Shing, Chen, Rosenthal, Moses, Lane, Cao, Sage, Follcman "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell,* 79:315-328, 1994.

O'Reilly, Boehm, Shing, Fukai, Vasios, Lane, Flynn, Birkhead, Olsen, Folkman "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell,* 88(2):277-285, 1997.

Palmiter y Brinster,"Transgenic Mice", *Cell,* 41:343-345, 1985.

Palmiter, Norstedt, Gelinas, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science,* 222:809-814, 1983.

Parmley y Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene,* 73(2):305-318, 1988.

Pearson y Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 85:2444-2448, 1988.

Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology,* 183:63-98, 1990.

Pepper, Ferrara, Orci, Montesano, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro," J. Cell Sci.,* 108(1):73-83, 1995.

Petersen, Wang, Yalcin-Chin, Li, Peyton, Minna, Harran, Wang, "Autocrine TNFa Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis", *Cancer Cell,* 12(5):445-456, 2007.

Petrova, Nykanen, Norrmen, Ivanov, Andersson, Haglund, Puolaldcainen, Wempe, von Melchner, Gradwohl, Vanharanta, Aaltonen, Saharinen, Gentile, Clarke, Taipale, Oliver, Alitalo, "Transcription factor PROX1 induces colon

cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype", *Cancer Cell,* 13(5):407-19, 2008.

Pike, Yao, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nalchasi, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta y Tosato, "Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth", *J. Exp. Med.,* 188(12):2349-2356, 1998.

Pike, Yao, Setsuda, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Atreya, Teruya- Feldstein, Wirth, Gupta y Tosato, "Calreticulin and Calreticulin Fragments Are Endothelial Cell Inhibitors That Suppress Tumor Growth", *Blood,* 94(7):2461-2468, 1999.

Plate, Breier, Weich, Mennel, Risau, "Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms," *Int. J. Cancer,* 59:520-529, 1994.

Potgens, Westphal, DeWaal, Ruiter, "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis," *In: Growth Factors in Tumor Angiogenesis,* Berlin: Walter de Gruyer & Co. pp. 57-70, 1995.

Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.,* 57:4593-4599, 1997.

Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody

mimetics comprising two complementarity- detennining regions and a framework region for tumor targetingl, *Nature Biotechnology,* 25(8): 921-929, 2007

Quinn, Thurman, Sundell, Zhang, Hellerqvist, "CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.,* 121(4):253-256, 1995.

Raychaudhury y D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforrning growth factor- beta," *J. Cell Biochem.,* 47(3):224-229, 1991.

Reif y Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology,* 40:25-35, 2001.

Reiter, Ulrich Brinlcmann, Lee y Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragements for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnology,* 14:1239-1245, 1996.

Richer y Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science,* 245:175-177, 1989.

Ryan, Eppler, Hagler, Bruner, Thomford, Hall, Shopp, O'Neill, "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody", *Toxicologic Pathology,* 27(1):78-86, 1999.

Sakamoto, Tanaka, Togho, Ogawa, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. 1,1:55-58,* 1986.

Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of

C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.,* 56:393-401, 1996.

Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Moleculár Cloning: A Laboratory Manual,* 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.,* 8(3):171- 177,1998.

Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", *Gene,* 54:113-123,1987.

Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", *Nature,* 329:840,1987.

Senger, Galli, Dvorak, Perruzzi, Harvey, Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular perineability factor that promotes accumulation of ascites fluid," *Science,* 219:983-985,1983.

Senger, Perruzzi, Feder, Dvorak, "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variet of human and rodent tumor cell lines," *Cancer Res.,* 46:5629-5632, 1986.

Senger, Cormolly, Vandewater, Feder, Dvorak, "Purification and NH2-terminal aminb acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular perrneability factor," *Cancer Res.,* 50:1774-1778,1990.

Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G.; Zanovello, P. &

Bronte, V. (2004). "Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells", *Cancer Immunol Immunother,* 53, 64-72.

Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice," *Nature,* 376:62-66,1995.

Sheibani y Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. NatL Acad. ScL USA,* 92(15):6788-6792,1995.

Sheu, Yen, Kan, "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta,* 1336(3):445-454,1997.

Shibuya, "Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis", *Angiogenesis,* 9(4):225-30,2007.

Shojaei, Wu, Malik, Zhong, Baldwin, Schanz, Fuh, Gerber, Ferrara, "Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells", *Nature Biotechnology,* 25:911-920, 2007.

Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fulcuhara, Hassan, *et al.,* "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.,* 1(6):631-642, 1989.

Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal

role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998.

Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Biosci (Bangalore)*, 11:47-58, 1987.

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.

Sipos, Tarnargo, Weingart, Brem, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.

Smith y Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. AppL Math.*, 2:482, 1981.

Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected * With Baculovirus Expression Vector", *Mol. Cell BioL*, 3:2156-2165, 1983.

Soff, Sanderowitz, Gately, Verrusio, Weiss, Brem, Kwaan, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.

Soker, Takashima, Miao, Neufeld, Klagsbrun., "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform- specific receptor for vascular endothelial growth factor," *Cell*, 92(6):735-745, 1998.

Springer, Chen, Kraft, Bednarski, Blau, "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis

in adults," *Mol. Cell,* 2(5):549-558, 1998.

Stella y Himrnelstein, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", *Directed Drug Delively,* Borchardt *et al.,* Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Sweetwyne, Brekken, Worlcman, Bradshaw, Carbon, Siadak, Mun-i y Sage, "Functional Analysis of the Matricellular Protein SPARC with Novel Monoclonal Antibodies", *J. Histochem. Cytochem.,* 52(6):723-733, 2004.

Tada, Fulcunaga, Wakabayashi, Masumi, Sato, Izumi, Kohno, Kuwano, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta,* 1201(2):135-142, 1994.

Takano, Gately, Neville, Herblin, Gross, Engelhard, Perricone, Eidsvoog, Brem, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits - endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.,* 54(10):2654-2660, 1994.

Tanaka, Manome, Wen, Kufe, Fine, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.,* 3(4):437-442, 1997.

Terman, Dougher-Vermazen, Carrion, Dimitrov, Armellino, Gospodarowicz, Bohlen, "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial

cell growth factor," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187:1579-1586, 1992.

Terman, Khandke, Dougher-Vermazan, Maglione, Lassam, Gospodarowicz, Persico, Bohlen, Eisinger, "VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor," *Growth Factors, 11(3):187-195,* 1994.

Thomas, "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent," *J. BioL Chem.*, 271:603-606, 1996.

Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignrnent through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.

Thorpe, Derbyshire, Andrade, Press, Knowles, King, Watson, Yang, Rao-Bette, "Heparin- Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.

Tischer, Mitchell, Hartman, Silva, Gospodarowicz, Fiddes, Abraham, "The human gene for vascular endothelial growth factor," *J. BioL Chem.*, 266:11947-11954, 1991.

Tolsma, Volpert, Good, Frazier, Polverini, Bouck, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.

Tryggvason, "The lannnin family," *Curr. Opin. Cell Biol. ,5(5):877-882,* 1993.

Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Nat!. Acad. ScL, USA,* 96(5):1904-9, 1999.

van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and 87.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.,* 310:591-601, 2001.

van dijk, Warriaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren y Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer,* 43:344-349, 1989.

Varfolomeev, Blankenship, Wayson, Fedorova, Kayagaki, Garg; Zobel, Dynek, Elliott, Wallweber, Flygare, Fairbrother, Deshayes, Dixit, Vucic, "IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF-icB Activation, and 'TNFa-Dependent Apoptosis", *Cell,* 131(4):669-681, 2007.

Vince, Wong, Khan, Feltham, Chau, Ahmed, Benetatos, Chunduru, Condon, McKinlay, Brink, Leverkus, Tergaonkar, Schneider, Callus, Koentgen, Vaux, Silke, "IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNFa-Dependent Apoptosis", *Cell,* 131(4):682-693, 2007.

Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Nat!. Acad. Sci. USA,* 95(11):6343-6348, 1998.

Vukanovic, Passaniti, Hirata, Traystman, Hartley-Asp, Isaacs, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.

Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature,* 376:732, 1995.

Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, Heldin, "Different signal transduction properties of KDR and Fltl, two receptors for vascular endothelial growth factor," *J. BioL Chem.*, 269(43):26988-26995, 1994.

Waltenberger, Mayr, Pentz, Hombach, "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia," *Circulation,* 94:1647-1654, 1996.

Waltenberger, Mayr, Frank, Hombach, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell CardioL,* 28(7):1523-1529, 1996.

Wamil, Thurman, Sundell, DeVore, Wakefield, Johnson, Wang, Hellerqvist, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trail," *J. Cancer Res. Clin. OncoL,* 123(3):173-179, 1997.

Ward, Giissow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia Cor, Nature,* 341(6242):544-546, 1989.

Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.

Whitehurst, Flister, Bagaitkar, Volk, Bivens, Pickett, Castro-Rivera, Breklcen, Gerard, Ran, "Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model", *Int. J. Cancer,* 121(10):2181-91, 2007.

Wiesmann, Fuh, Christinger, Eigenbrot, Wells, de Vos, "Crystal structure at 1.7 A resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell,* 91(5):695-704, 1997.

Willman *et al.,* "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.,* 14:375-382, 1988. Winter y Milstein, "Man-made antibodies," *Nature,* 349:293-299, 1991.

Wolff, Guerin, Laterra, Bressler, Indurti, Brem, Goldstein, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo," Klin. Padiatr.,* 209(4):275-277, 1997.

Wyckoff, Wang, Lin, Wang, Pixley, Stanley, Graf, Pollard, Segall y Condeelis, "A Paracrine Loop Between Tumor Cells and Macrophages is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors", *Cancer Res.,* 64:7022-7029, 2004.

Xie, Chen, Fu, Harter, Young, Sunkara, Novak, Villanueva-Siles, Ratech, "Podoplanin (d2-40): a new immunohistochemical marker for reactive follicular dendritic cells and follicular dendritic cell sarcomas", *Int. J. Clin. Exp. PathoL,* 1(3):276-84, 2008.

Yoon, Yoo, Choi, Do, Kang, Lee, Azuma, Kim, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (Viscum album coloratum) extract on tumour angiogenesis and metastasis of

haematogenous and non- haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett,* 97(1):83-91, 1995.

Yoshida, Kaneko, Tsukamoto, Han, Ichinose, Kimura, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fiimagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.,* 58(16):3751-3756, 1998.

Young, MacKenzie, Narang, Oomen y Baenziger, "'Thermal Stabilization of a Single- Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters,* 16396(377):135-139, 1995.

Yamamura, Kibbey, Jun, Kleinman, "Effect of Matrigel y laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer BioL,* 4(4):259-265, 1993.

Zachary, "Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal," *Exp. Nephrol.,* 6(6):480-487, 1998.

Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", *Hollaender y Setlow (eds),* Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.

Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Abl Fragments For Efficient Production in *Escherichia Coli* and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.,* 8(10):1057-1062, 1995.

Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu', Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of

Glycoproteins", *Science,* 303(5656): 371-373, 2004.

Ziche, Donnini, Morbidelli, Parenti, Gasparini, Ledda, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer, 77(7):1123-1129,* 1998.

Zou, Anisowicz, Hendrix, Thor, Neveu, Sheng, Rafidi, Seftor, Sager, "Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells", *Science,* 28:263(5146):526-9, 1994.

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo aislado que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), caracterizado porque comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(a) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta, y

(c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

2. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque una o más de las CDR de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste de:

(a) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia

sustancialmente homóloga a esta misma,

(b) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta misma, y

(c) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

en donde la secuencia sustancialmente homologa es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

3. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque se seleccionan dos o más de las CDR de región variable de cadena pesada del grupo que consiste de:

(a) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(b) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(c) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o una secuencia sustancialmente homóloga esta,

en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en

donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

4. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque tres de las CDR de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste de:

(a) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(b) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(c) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

5. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta.

6. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la región

variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta.

7. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta.

8. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque es un anticuerpo completamente humano.

9. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque es un anticuerpo entero que comprende una región constante de anticuerpo.

10. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque es un anticuerpo tipo IgG.

11. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, caracterizado porque comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta.

12. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.

13. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo es un Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, Fd, DAB, dímero de TandAb, anticuerpo lineal, minicuerpo, diacuerpo o fragmento biespecífico de anticuerpo.

14. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque tiene una afinidad de unión para VEGF que corresponde a una Kd de menos de 10nM cuando el anticuerpo está en un formato tipo IgG.

15. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque se une al menos un primer agente terapéuticos o de diagnóstico.

16. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque se une a al menos un primer agente radioterapéutico, agente quimioterapéutico, agente anti-angiogénico, agente inductor de apoptosis, agente anti-tubulina, agente anti-celular o citotóxico, esteroide, citocina, quimiocina o coagulante.

17. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque se une a:

(a) un radioisotopo de arsénico;

(b) taxol, docetaxel, paclitaxel, cisplatina, gemcitabina, una combretastatina, doxorubicina o adriamicina;

(c) una ricina, gelonina, abrina, difteria, pseudomonas o toxina de pertussis;

(d) un inhibidor de ATPasa tipo V;

(e) IL-2, IL-12, TNF-α, un interferón o LEC; o

(f) Factor de Tejido truncado.

18. Anticuerpo aislado que se une a VEGF e inhibe de manera significativa a la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir de manera significativa la unión de VEGF al receptor de VEGF VEGFR1 (Flt-1); caracterizado porque comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(a) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

(b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta, y

(c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

19. Anticuerpo aislado que se une a VEGF y que tiene una afinidad de unión para VEGF que corresponde a una Kd de menos de 10nM cuando el anticuerpo está en un formato

de IgG; caracterizado porque comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR, y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de la cadena ligera comprende:

(a) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

(b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

20. Anticuerpo aislado que se une al menos VEGF humano y VEGF de ratón; caracterizado porque al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de la cadena ligera comprende:

(a) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

(b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a esta,

en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácido en comparación a la secuencia dada de CDR, o en donde la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones conservadoras de aminoácido de la secuencia dada de CDR.

21. Inmunoconjugado caracterizado porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 unido al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico.

22. Composición caracterizada porque comprende al menos un primer anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o un inmunoconjugado del mismo.

23. Composición de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque es una composición farmacéuticamente aceptable.

24. Composición de conformidad con la reivindicación 22 o la reivindicación 23, caracterizada porque además comprende al menos un segundo agente terapéutico.

25. Molécula de ácido nucleico caracterizada porque comprende una región de secuencia de nucleótidos que

codifica para el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

26. Molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque la región de secuencia de nucleótidos codifica para un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta.

27. Molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque la región de secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de nucleótidos de of SEQ ID NO:20.

28. Molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque la región de secuencia de nucleótidos codifica para una anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de esta.

29. Molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizada porque la región de secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO:24 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:22 y en donde la región de secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO:25 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.23.

30. Vector de expresión caracterizado porque

comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29.

31. Célula hospedadora caracterizada porque comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 o el vector de expresión de la reivindicación 30.

32. Virus caracterizado porque comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 o el vector de expresión de la reivindicación 30.

33. Kit caracterizado porque comprende, en al menos un primer recipiente:

(a) el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20;

(b) el inmunoconjugado de la reivindicación 21;

(c) la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24;

(d) la molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29;

(e) el vector de expresión de la reivindicación 30;

(f) la célula hospedadoras de la reivindicación 31; o

(g) el virus de la reivindicación 32.

34. Método para producir un anticuerpo, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 30 bajo condiciones efectivas para expresar el anticuerpo

codificado; y

(b) obtener el anticuerpo expresado de la célula hospedadora.

35. Método para la unión de VEGF, caracterizado porque comprende poner en contacto una composición que comprende VEGF con el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo. 36. Método para detectar VEGF, caracterizado porque comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener VEGF con el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo y para detectar los complejos formados de este modo.

37. Método para diagnosticar una enfermedad asociada con angiogénesis en un animal, caracterizado porque comprende:

(a) poner en contacto una muestra de prueba del animal con el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de complejos de VEGF/anticuerpo;

(b) detectar los complejos de VEGF/anticuerpo formados de este modo, determinando así la cantidad de VEGF en la muestra de prueba; y

(c) comparar la cantidad de VEGF en la muestra de prueba en la cantidad de VEGF en una muestra de control correspondiente, en donde una cantidad incrementada de VEGF

en la muestra de prueba con relación a la cantidad de VEGF en la muestra de control es indicativa de una enfermedad asociada con angiogénesis.

38. Método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque la muestra de prueba de aísla del animal y se pone en contacto con el anticuerpo o inmunoconjugado *in vitro*.

39. Método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el anticuerpo o inmunoconjugado se administra al animal, contactando de este modo la muestra de prueba *in vivo*.

40. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, caracterizado porque la enfermedad asociada con angiogénesis es cáncer.

41. Método para inhibir la angiogénesis o linfangiogénesis, caracterizado porque comprende administrar el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo, a un animal en una cantidad efectiva para inhibir la angiogénesis o linfangiogénesis en el animal.

42. Método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado el animal tiene cáncer o una enfermedad neovascular ocular.

43. Método de conformidad con la reivindicación 41 o la reivindicación 42, caracterizado porque el animal es un sujeto humano.

44. Método para tratar una enfermedad asociada con angiogénesis, caracterizado porque comprende administrar un animal con la enfermedad a una cantidad

terapéuticamente efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo.

45. Método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque el animal tiene enfermedad neovascular ocular, degeneración macular, degeneración macular relacionadas a la edad, artritis, artritis reumatoide, aterosclerosis, retinopatía diabética, hiperplasia de la glándula tiroides, enfermedad de Grave, hemangioma, glaucoma neovascular o psoriasis.

46. Método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque el animal tiene cáncer.

47. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46, caracterizado porque además comprende administrar un segundo agente terapéutico al animal.

48. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, caracterizado porque el animal es un sujeto humano.

49. Método para tratar una enfermedad asociada con linfaangiogénesis, caracterizado porque comprende administrar a un animal con la enfermedad a una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo.

50. Método de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque el animal tiene cáncer.

51. Método de conformidad con la reivindicación 49 o la reivindicación 50, caracterizado porque el animal

es un sujeto humano.

52. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo, caracterizado porque es para el uso en terapia o diagnosis.

53. Anticuerpo inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque es para el uso en terapia o diagnóstico de una enfermedad asociada con angiogénesis o linfangiogénesis.

54. Anticuerpo o inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 52 o la reivindicación 53, caracterizado porque es para el uso en terapia o diagnosis de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de cáncer, enfermedad neovascular ocular, degeneración macular, degeneración macular relacionada a la edad, artritis, artritis reumatoide, aterosclerosis, retinopatía diabética, hiperplasia de la glándula tiroides, enfermedad de Grave, hemangioma, glaucoma neovascular o psoriasis.

55. Anticuerpo o inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 52 a 54, caracterizado porque es para el uso en terapia de diagnosis, que comprende además el uso de un segundo agente terapéutico.

56. Anticuerpo o inmunoconjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 52 a 5, caracterizado porque la terapia de diagnosis se lleva a cabo en un sujeto humano.

57. Uso del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un inmunoconjugado del mismo, en la elaboración de un medicamento para tratar enfermedad al inhibir angiogénesis o linfagiogénesis.

58. Uso de conformidad con la reivindicación 57 en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de cáncer, enfermedad neovascular ocular, degeneración macular, degeneración macular relacionada a la edad, artritis, artritis reumatoide, aterosclerosis, retinopatía diabética, hiperplasia de la glándula tiroides, enfermedad de Grave, hemangioma, glaucoma neovascular o psoriasis.

59. Uso de conformidad con la reivindicación 57 o reivindicación 58 que comprende además el uso de un segundo agente terapéutico.

60. Uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59 donde el tratamiento se lleva a cabo en un sujeto humano.

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describen anticuerpos humanos que inhiben de manera específica la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores primarios de VEGF. Los anticuerpos inhiben de manera efectiva la angiogénesis e inducen regresión tumoral, y aún tienen seguridad mejorada debido a su especificidad. La presente invención proporciona de este modo nuevas composiciones, métodos yo protocolos combinados, basados en anticuerpos humanos, para tratar cáncer y otras enfermedades angiogénicas. También se proporcionan composiciones y métodos ventajosos de inmunoconjugado que usan los nuevos anticuerpos humanos específicos de VEGF.

Figura 1A

CCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGG

NcoI |--------- VH Inicio (SEQ ID No20 Inicio)

CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAG

CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTGAA

GATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACA

CATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGT

GTATTACTGTGCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCATTATACCTTTTAACGGT

ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA*AAGCTTTCAGGGAGTG*

VH Final ------‖-- HindIII--- Inicio de ligador

*CATCCGCCCCAAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTA*GACATCCGGAT

extremo de ligador ---------MluI----‖------- VL Inicio

GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC

CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG

CCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT

CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA

GATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGGAG

GGACCAAGGTGGAGATCAAA*GCGGCCGC* (SEQ ID No. 30)

(SEQ ID No.20 Final) VL Final ---| NotI

Figura 1B

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGET

|-------- VH Inicio (SEQ ID No 21 Inicio)

IYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIPFNGMDVW

GQGTTVTVSS*KLSGSASAPKLEEGEFSEARV*DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ

VH Final---------‖------Ligador----------Ligador----‖---- VL Inicio

SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT

YYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK

(SEQ ID No21 Final) VL Final -----|

# Figura 2

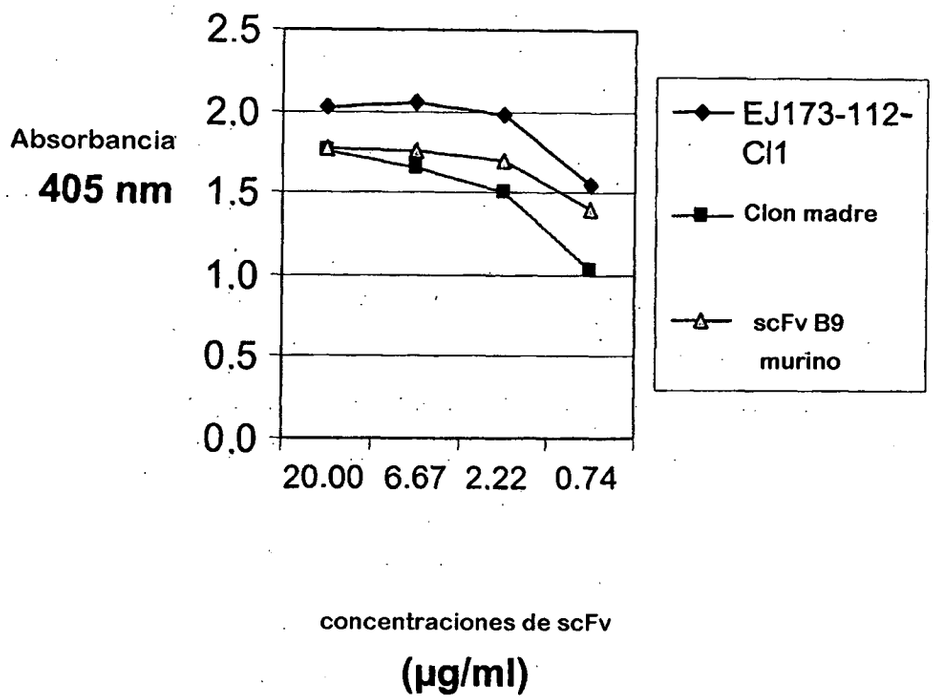

Absorbancia
405 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
20.00
6.67
2.22
0.74
EJ173-112-Cl1
Clon madre
scFv B9 murino
concentraciones de scFv
(µg/ml)

Figura 3

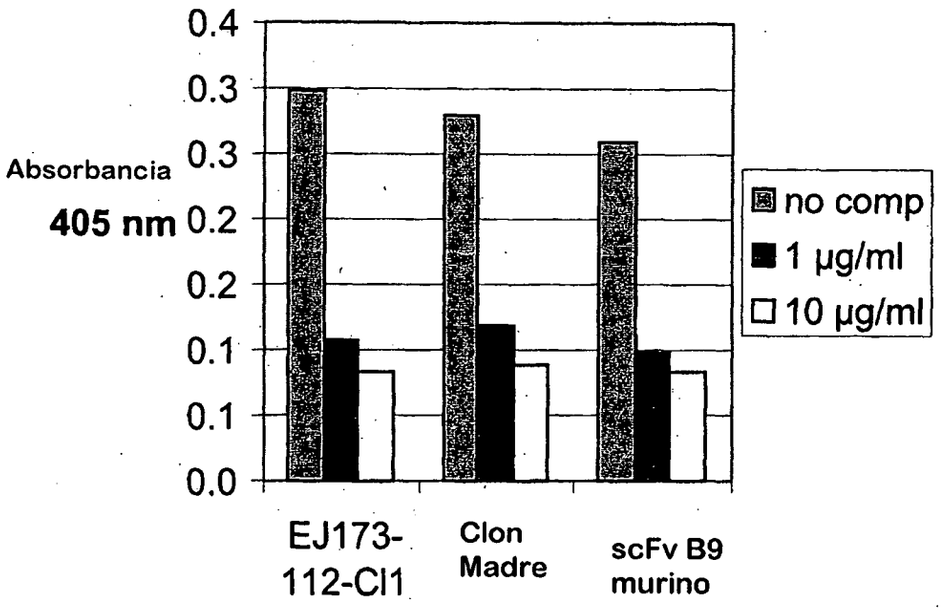

Absorbancia
405 nm
0.4
0.3
0.3
0.2
0.2
0.1
0.1
0.0
EJ173-112-Cl1
Clon Madre
scFv B9 murino
no comp
1 µg/ml
10 µg/ml

Figura 4

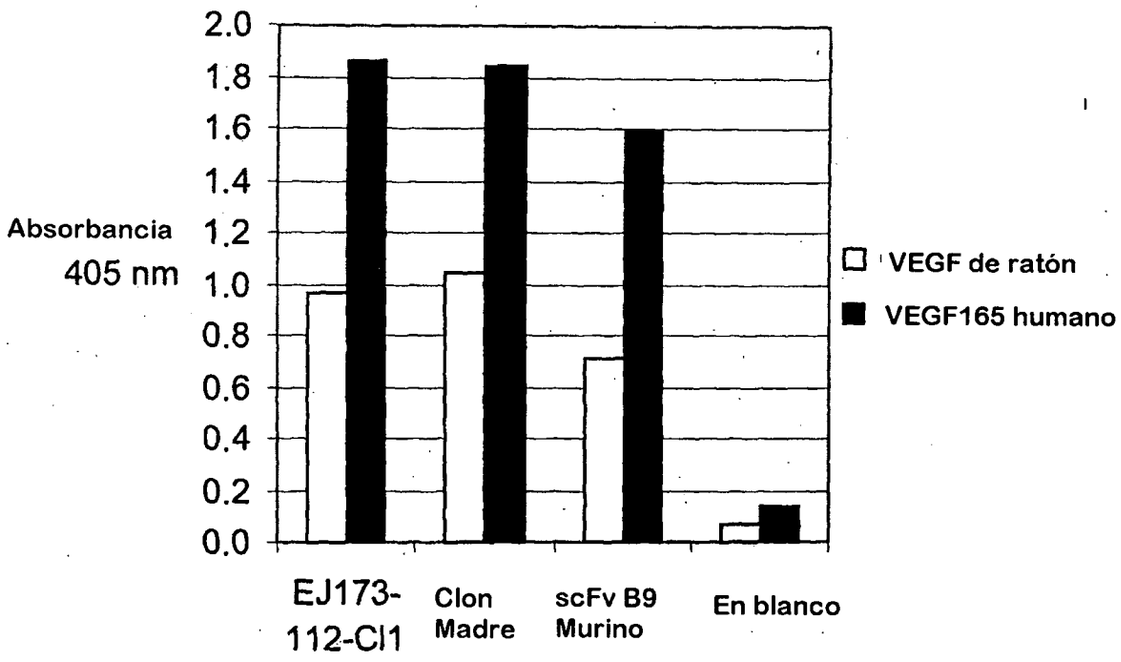

Absorbancia
405 nm
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
EJ173-112-Cl1
Clon Madre
scFv B9 Murino
En blanco
VEGF de ratón
VEGF165 humano

Figura 5

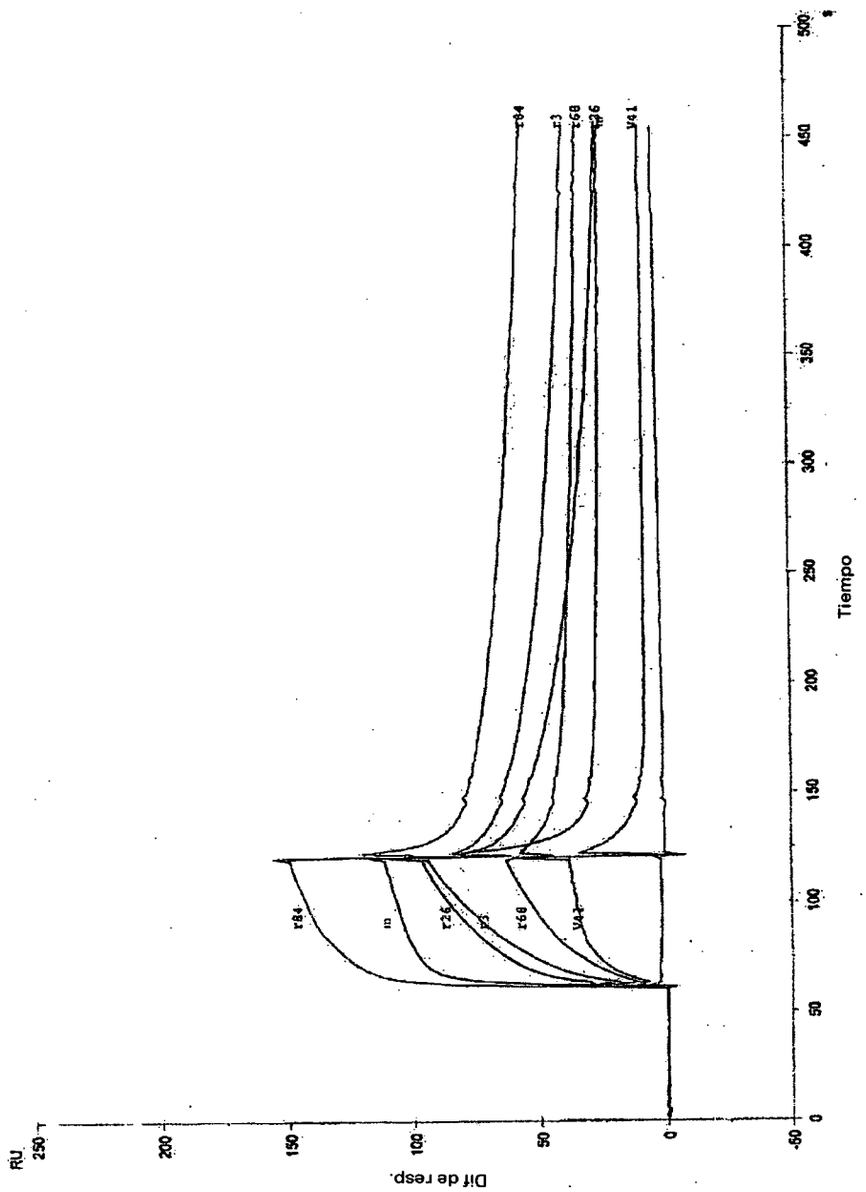

RU
250
200
150
100
50
0
Dif de resp.
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
Tiempo
r84
r3
r68
r96
V41
r84
m
r25
r3
r68
V41

Figura 6

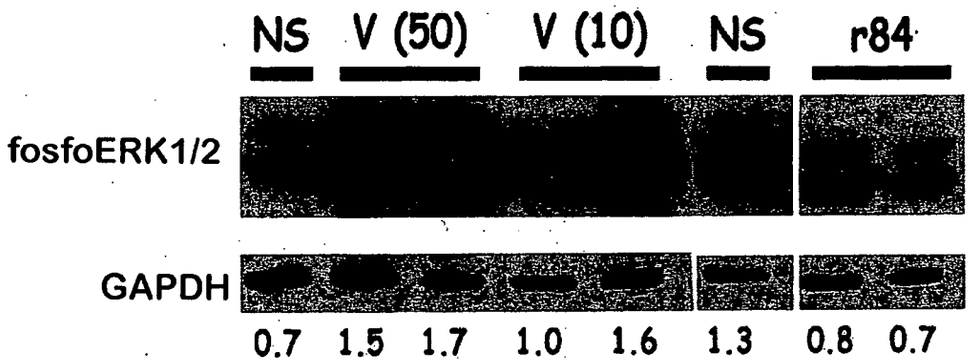


Figura 7

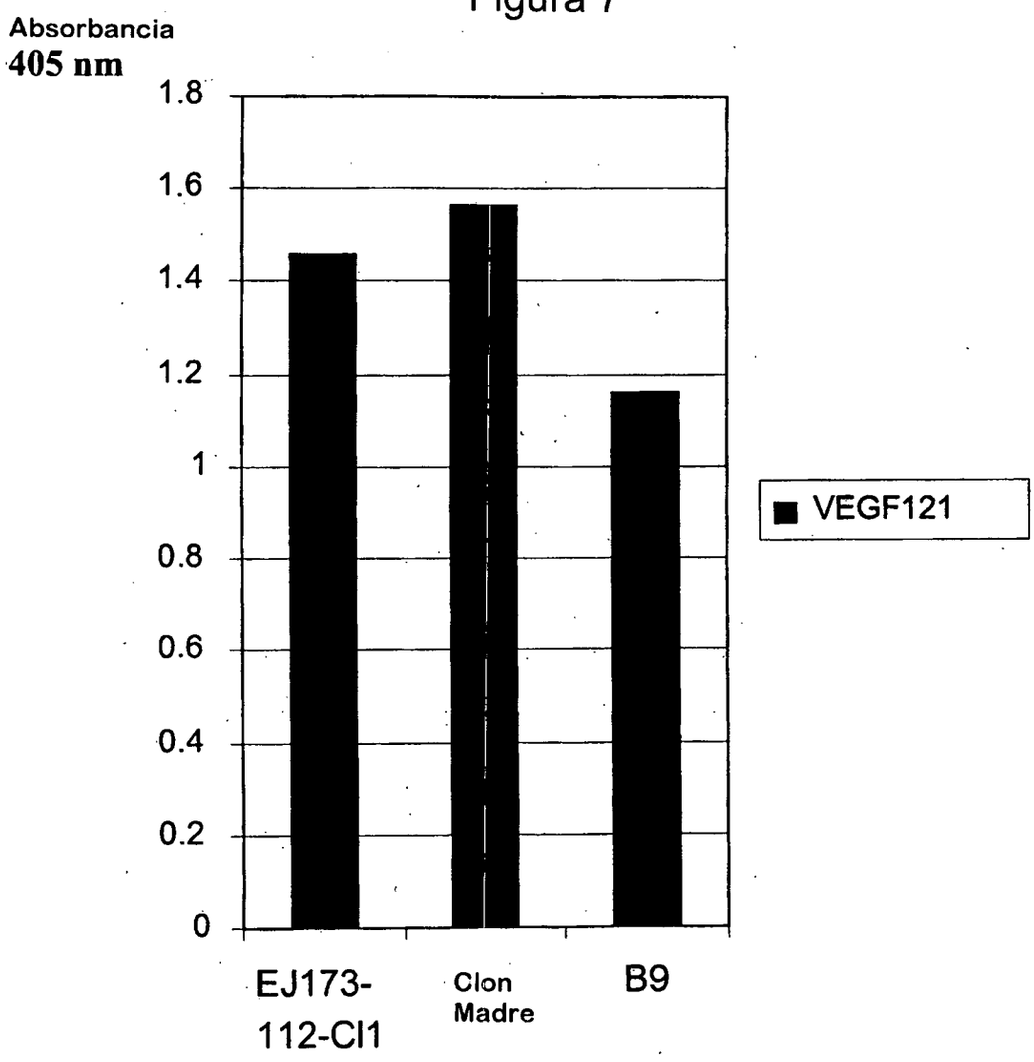

Absorbancia
405 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
EJ173-112-Cl1
Clon Madre
B9
VEGF121

Figura 8A

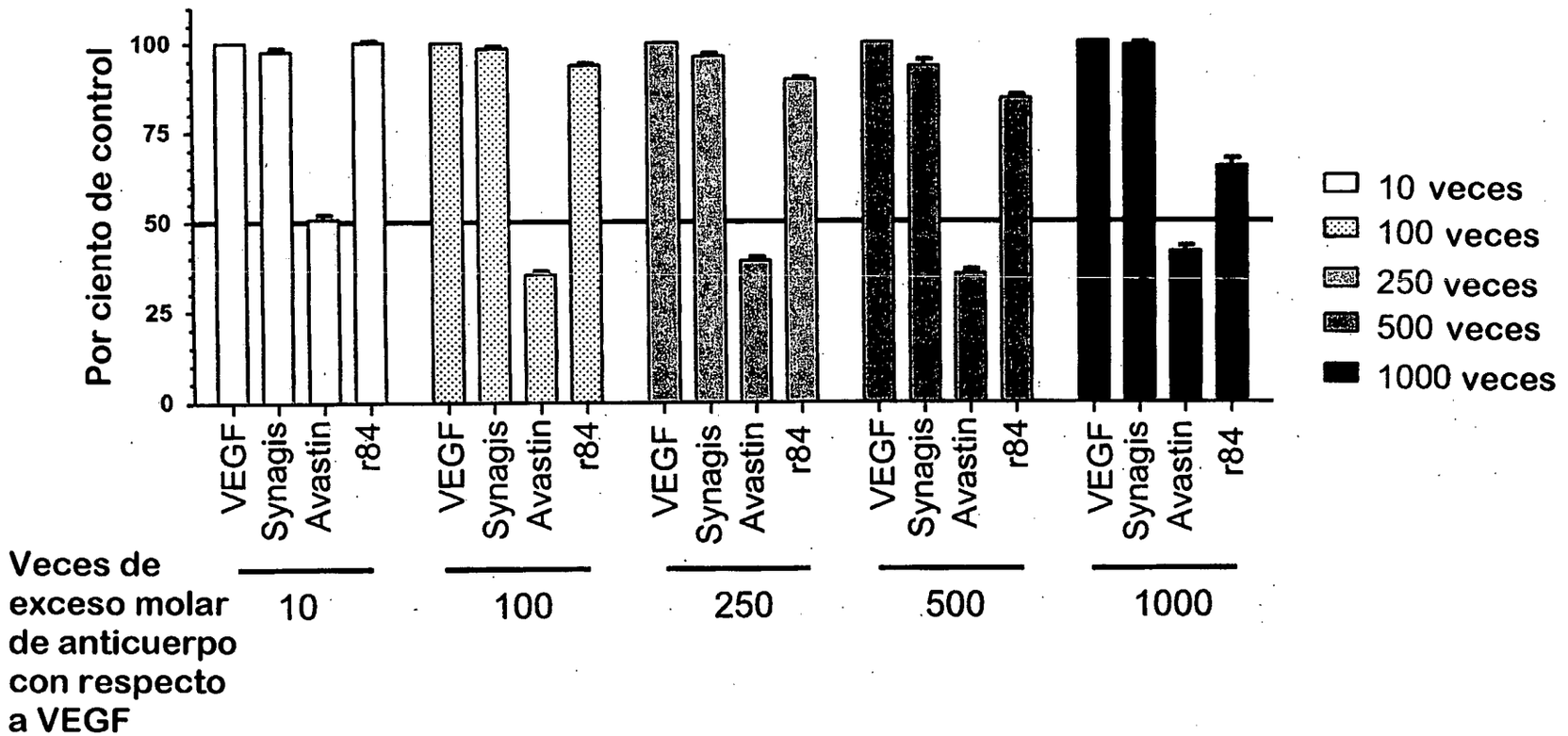

Por ciento de control
100
75
50
25
0
VEGF
Synagis
Avastin
r84
Veces de exceso molar de anticuerpo con respecto a VEGF
10
100
250
500
1000
10 veces
100 veces
250 veces
500 veces
1000 veces

Figura 8B

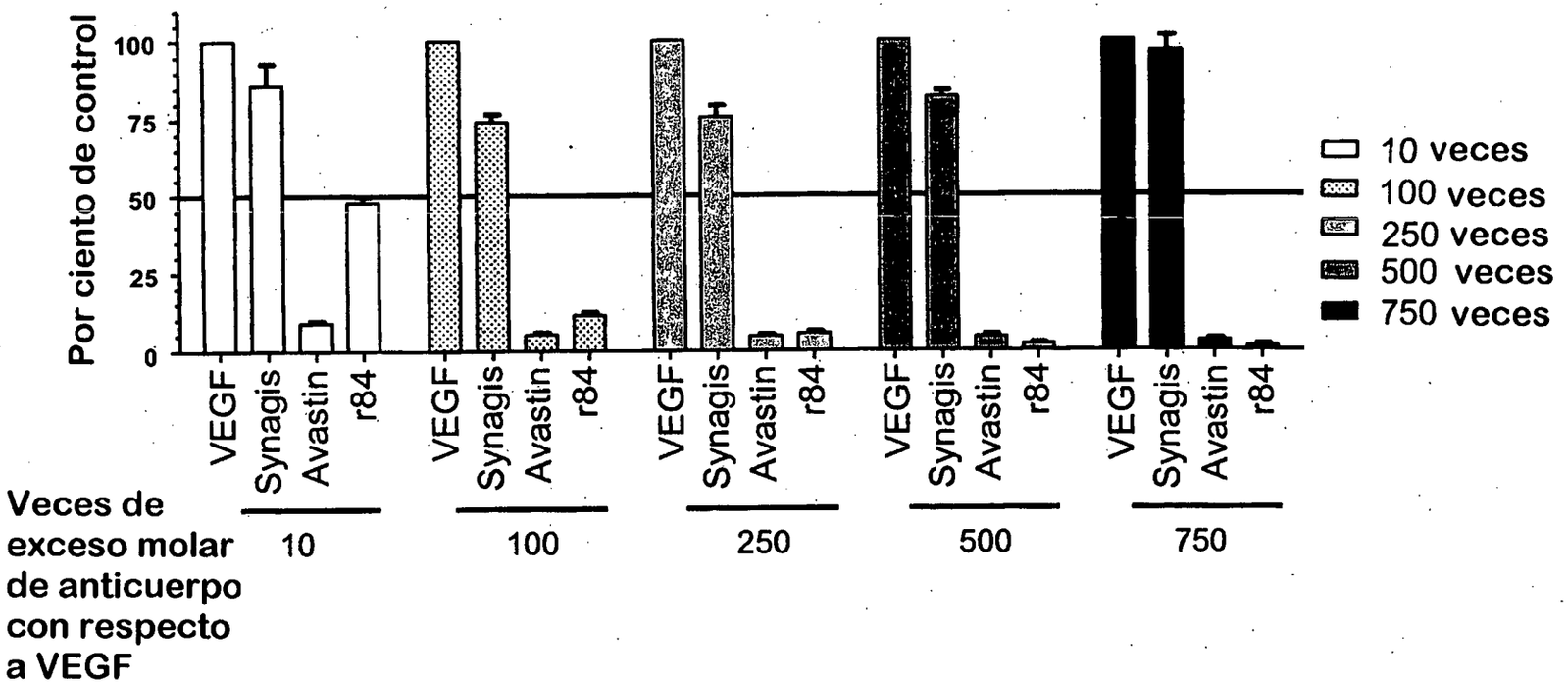

Por ciento de control
100
75
50
25
0
VEGF
Synagis
Avastin
r84
10 veces
100 veces
250 veces
500 veces
750 veces
Veces de exceso molar de anticuerpo con respecto a VEGF
10
100
250
500
750

Figura 9A

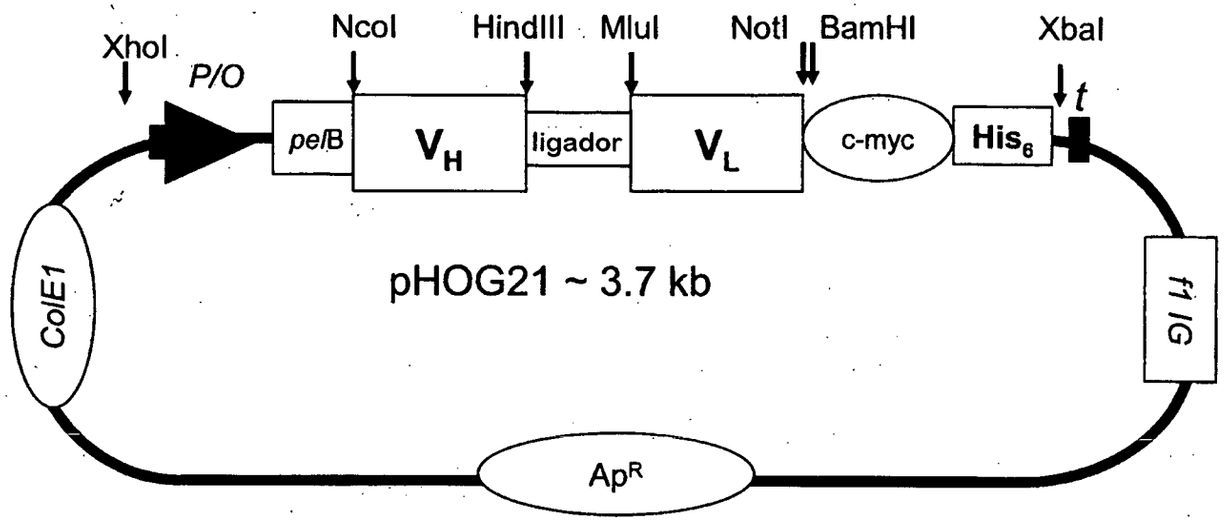



Figura 9B

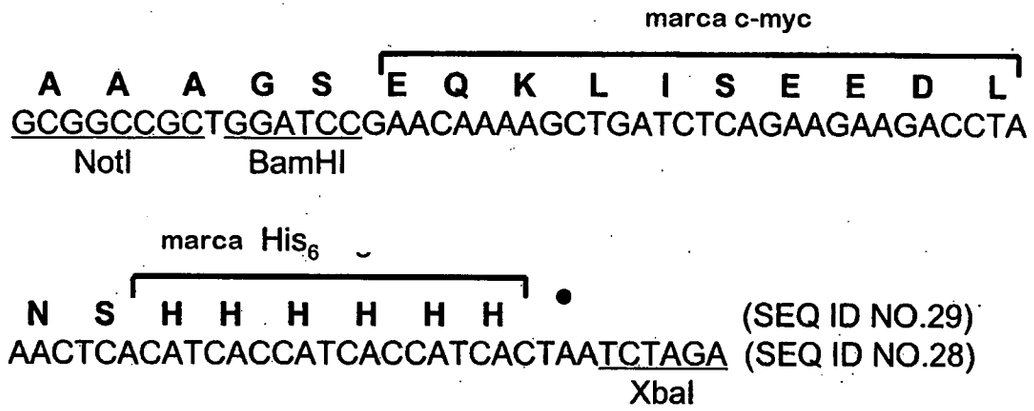


Figura 10A

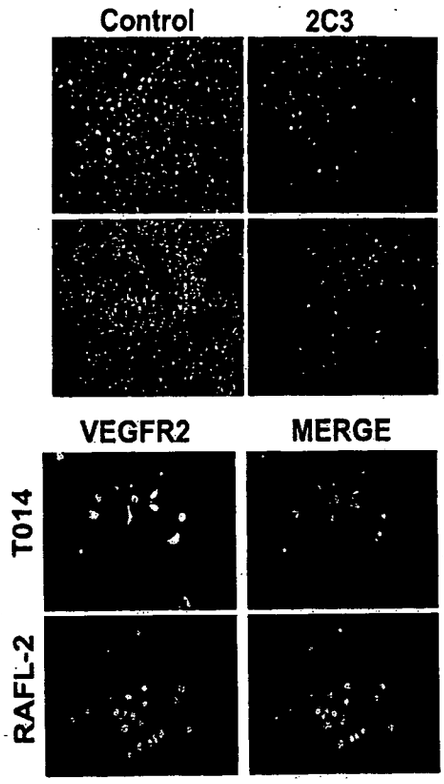



Figura 10B

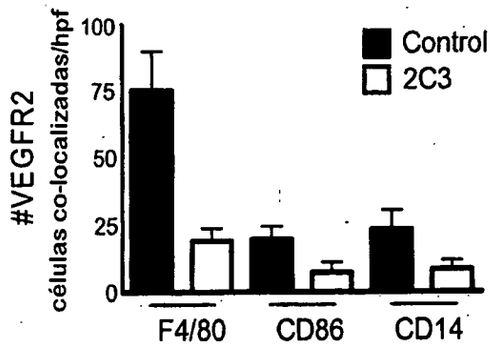



Figura 10C

Figura 11

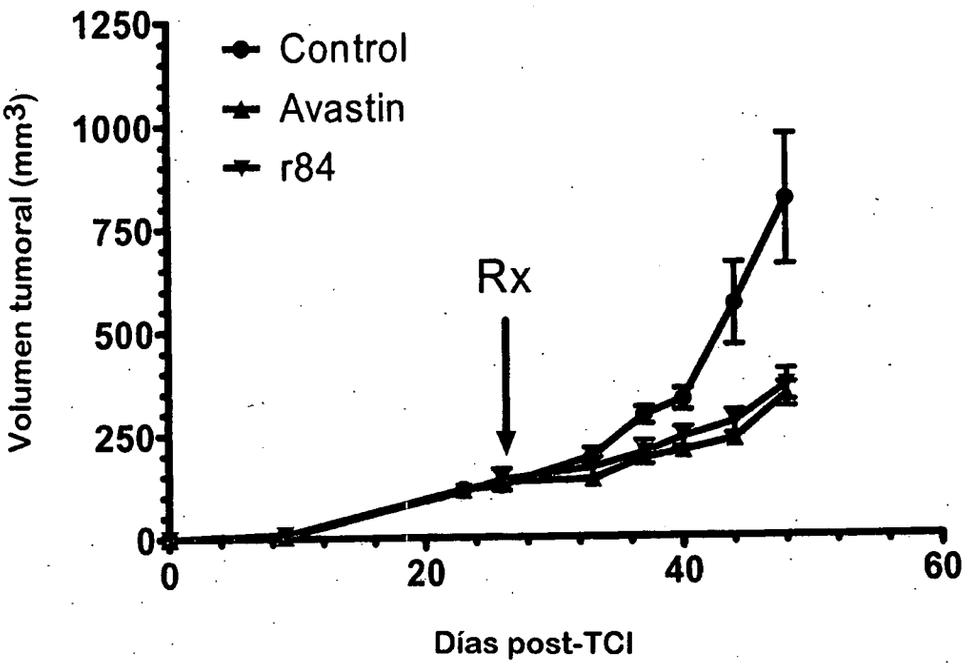

1250
1000
750
500
250
0
Volumen tumoral (mm3)
Control
Avastin
r84
Rx
0
20
40
60
Días post-TCI

Figura 12

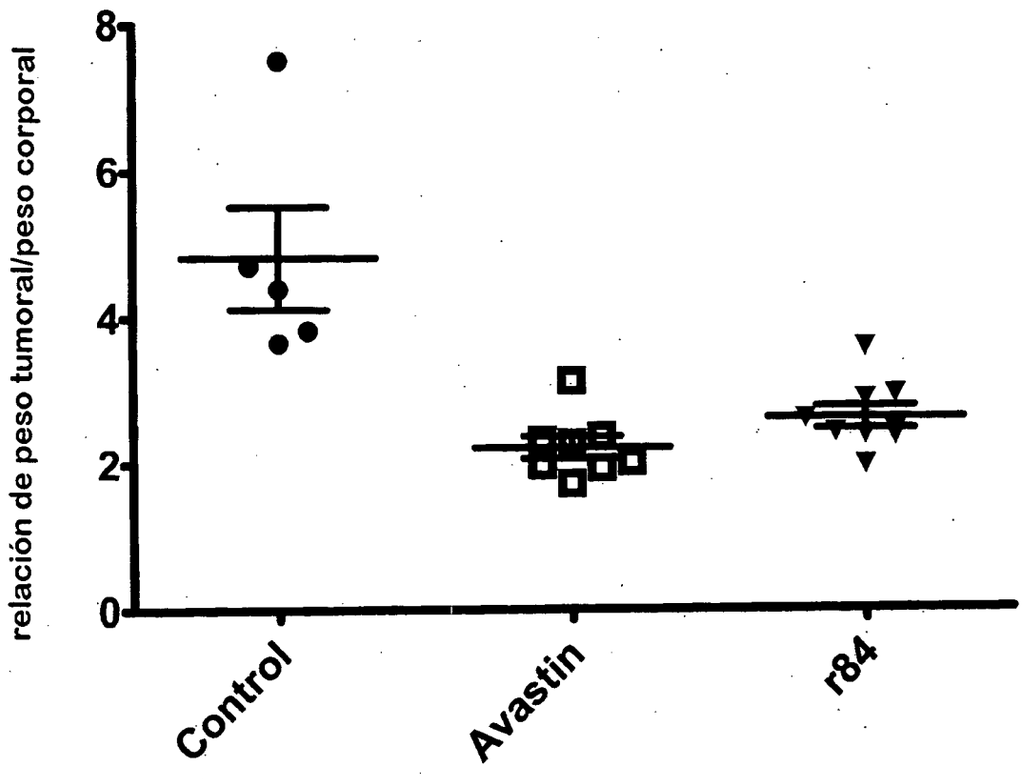

relación de peso tumoral/peso corporal
8
6
4
2
0
Control
Avastin
r84

Figura 13

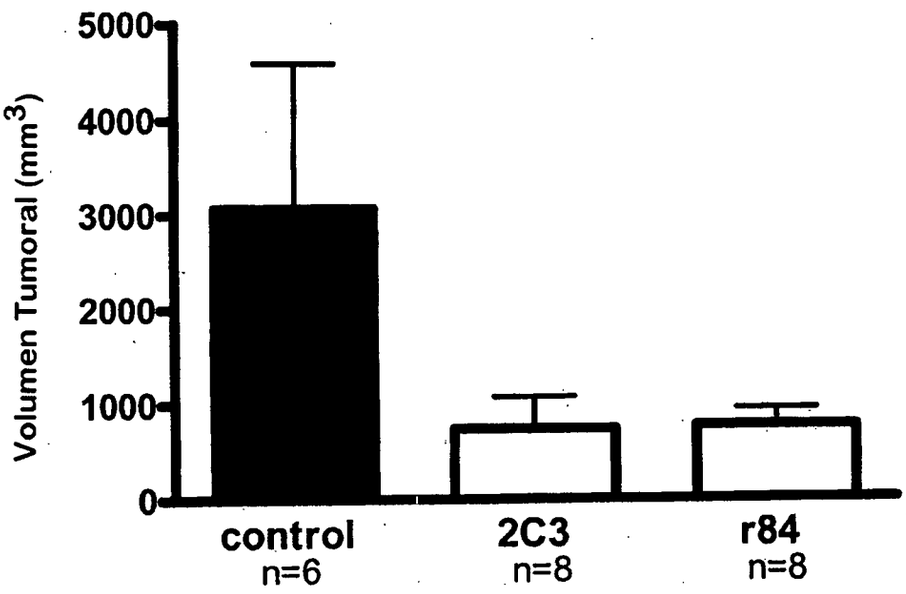

Volumen Tumoral (mm3)
5000
4000
3000
2000
1000
0
control
n=6
2C3
n=8
r84
n=8

Figura 14

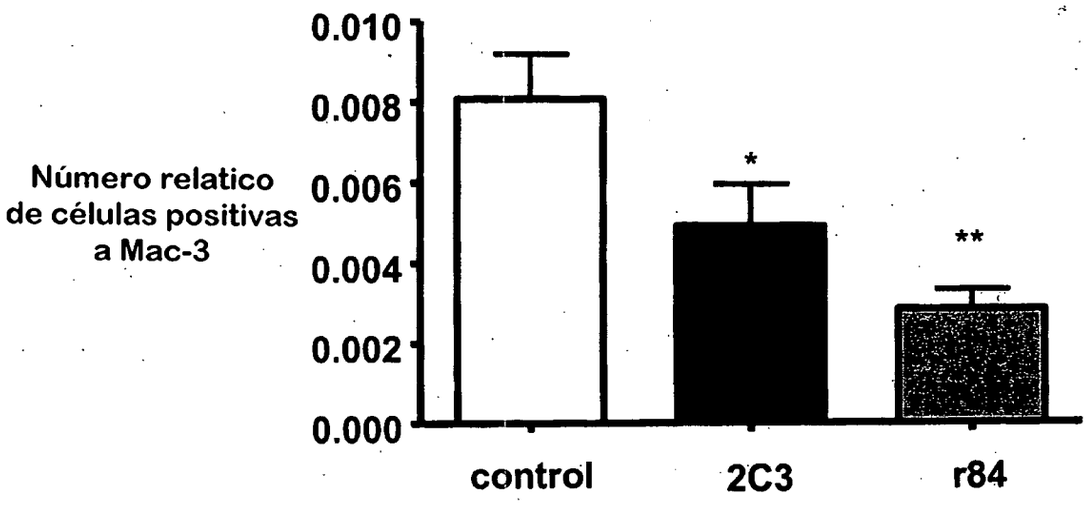
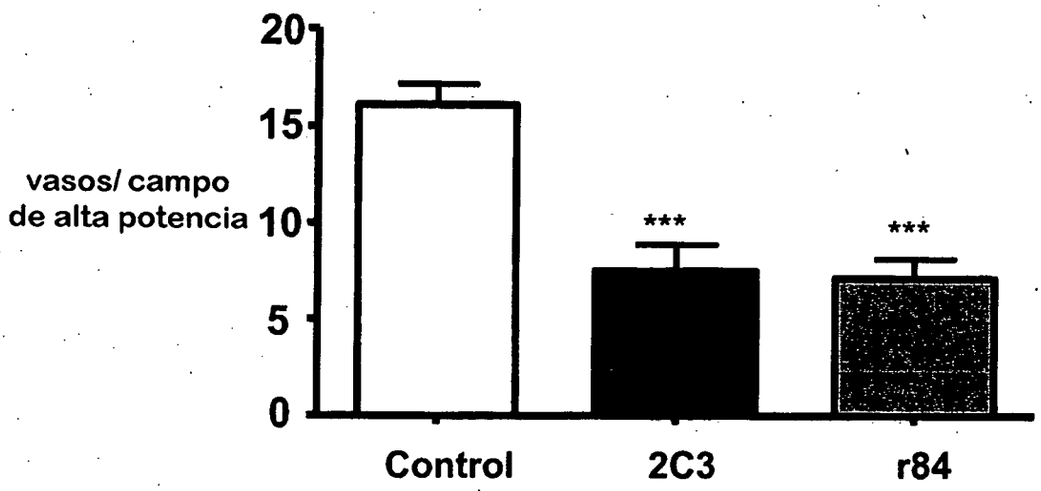

Número relatico de células positivas a Mac-3
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
*
**
control
2C3
r84

Figura 15



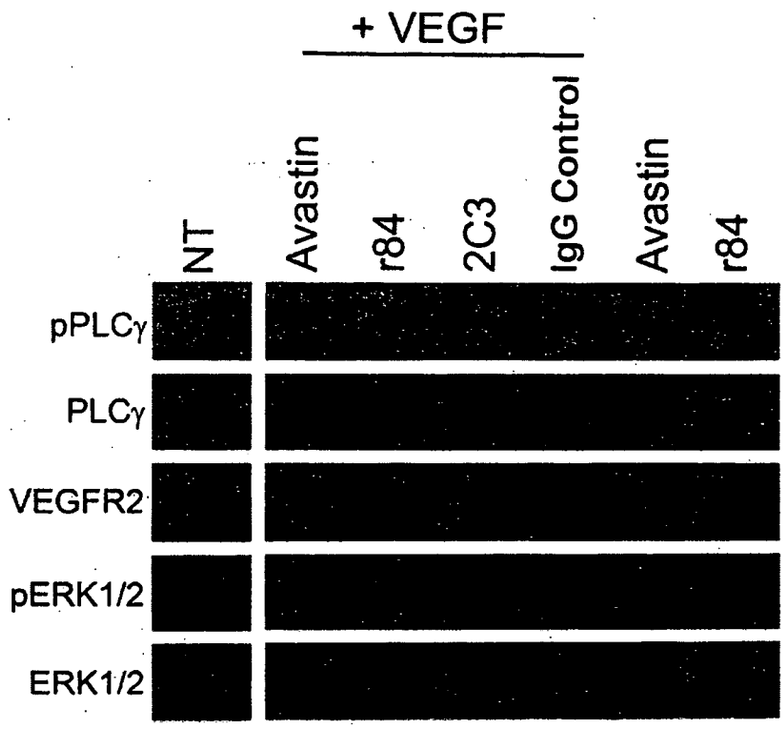



Figura 16A

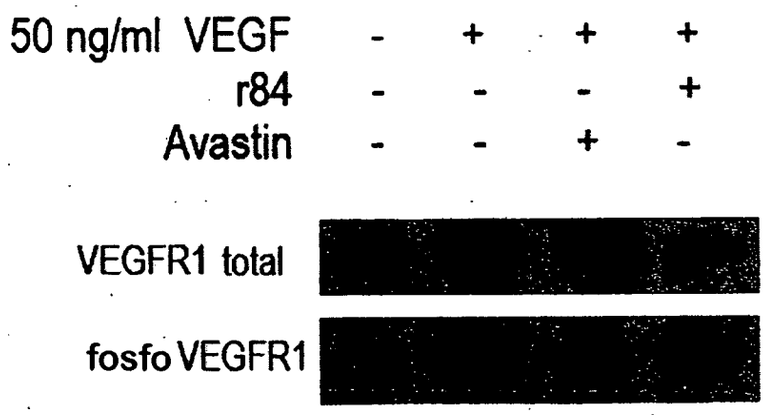



Figura 16B

Figura 17A

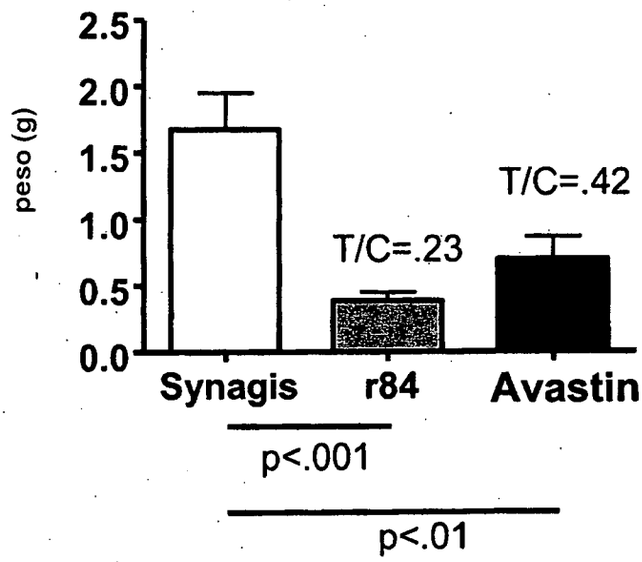



Figura 17B

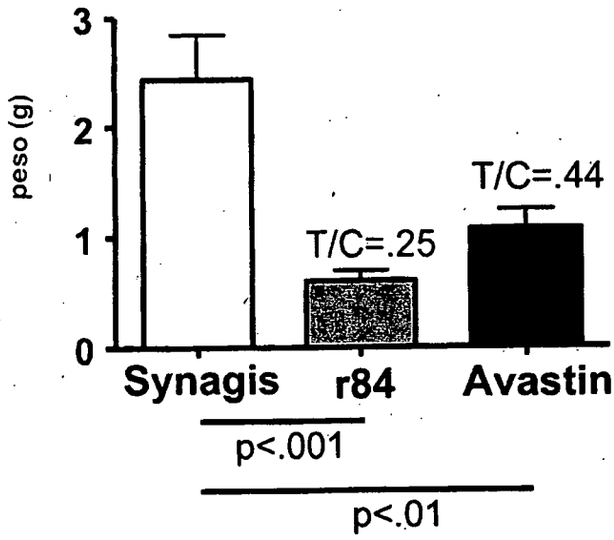


Figura 17C

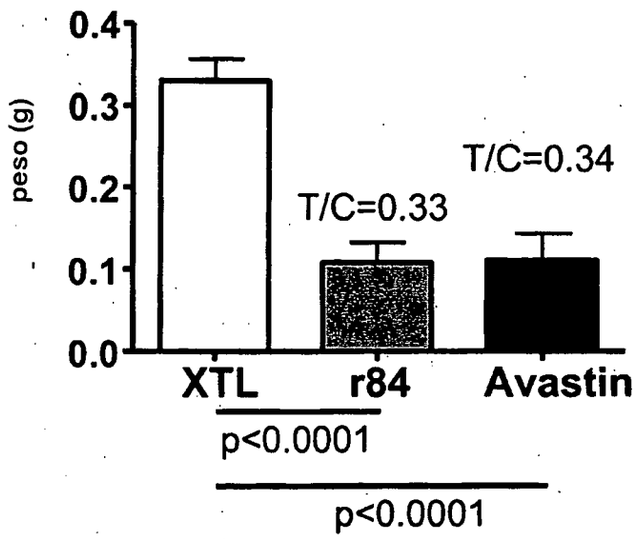



Figura 17D

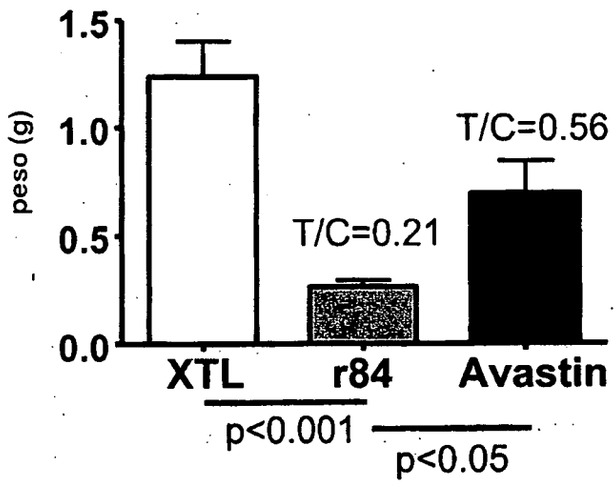


Figura 18A(a)

Figura 18A(b)

Figura 18A(c)

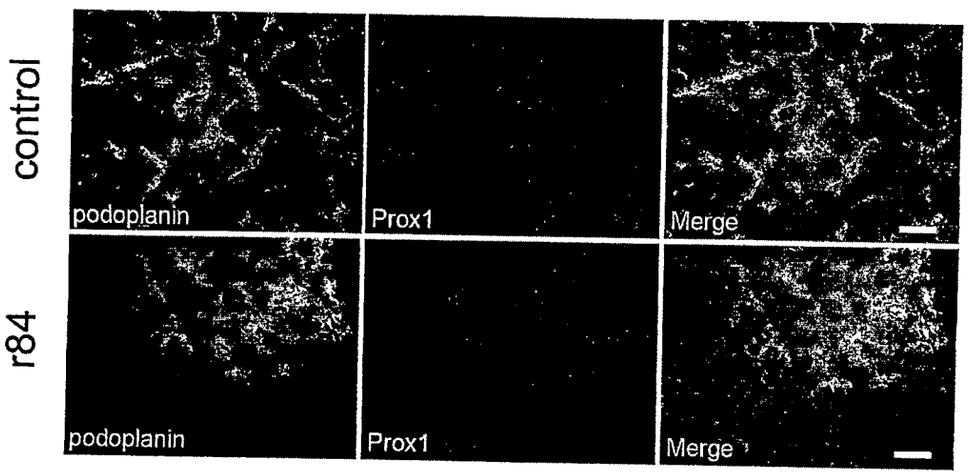



Figura 18A(d)

Figura 18A(e)

Figura 18A(f)

Figura 18B(a)

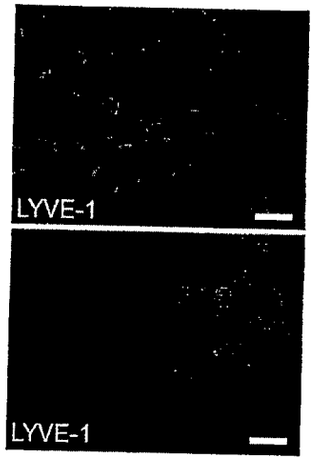



Figura 18B(b)

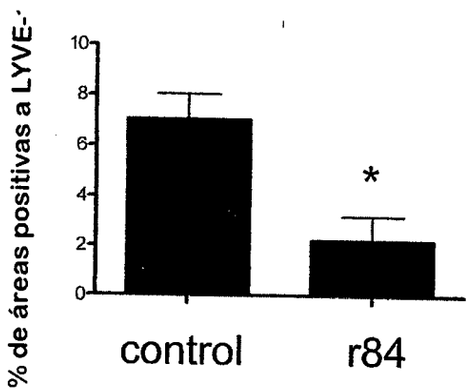



Figura 18C

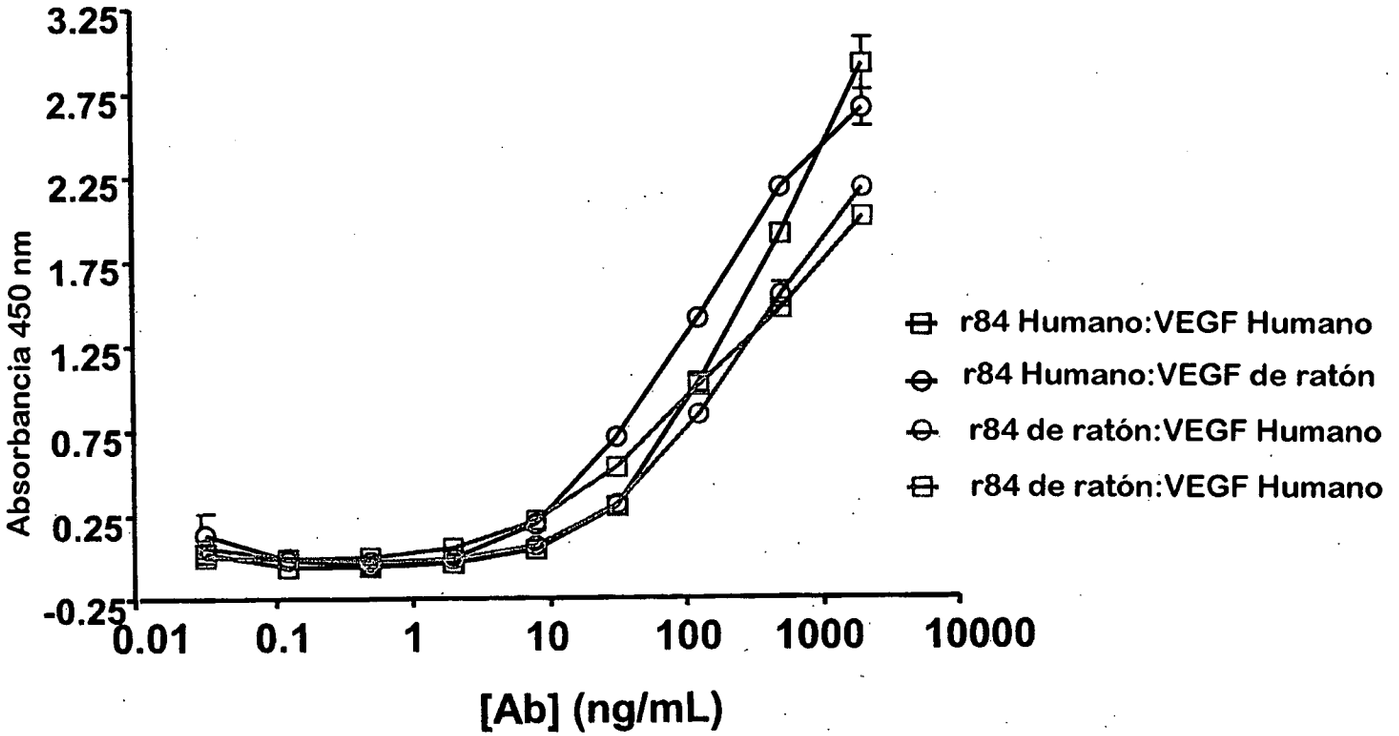

3.25
2.75
2.25
1.75
1.25
0.75
0.25
-0.25
Absorbancia 450 nm
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] (ng/mL)
r84 Humano:VEGF Humano
r84 Humano:VEGF de ratón
r84 de ratón:VEGF Humano
r84 de ratón:VEGF Humano

Figura 19

Figura 20A

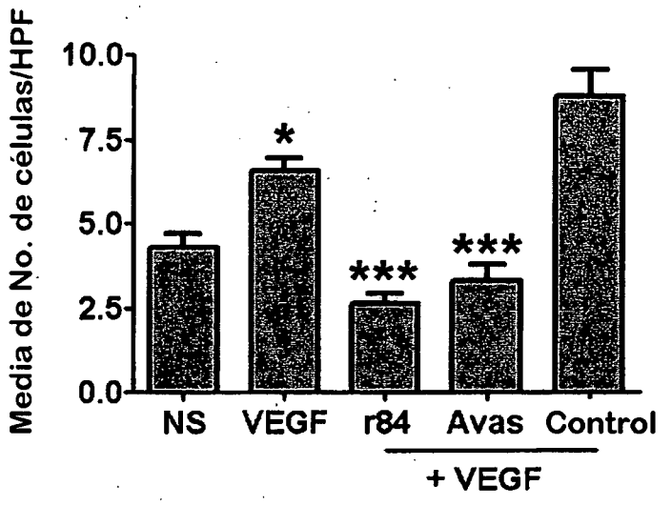



Figura 20B

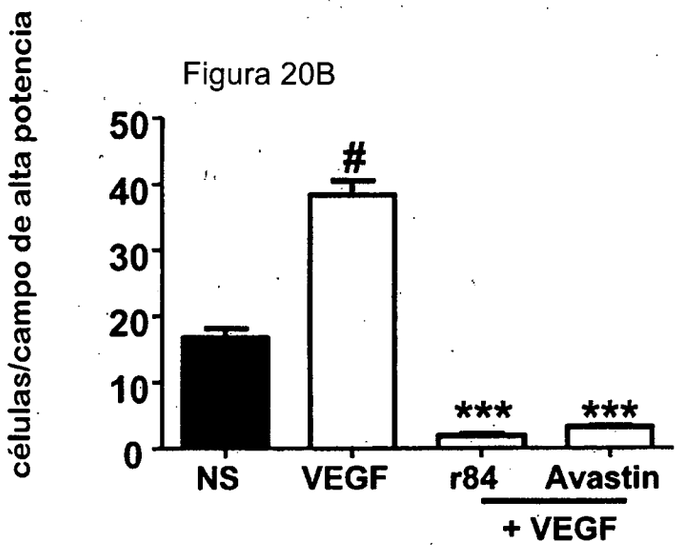


Figura 21

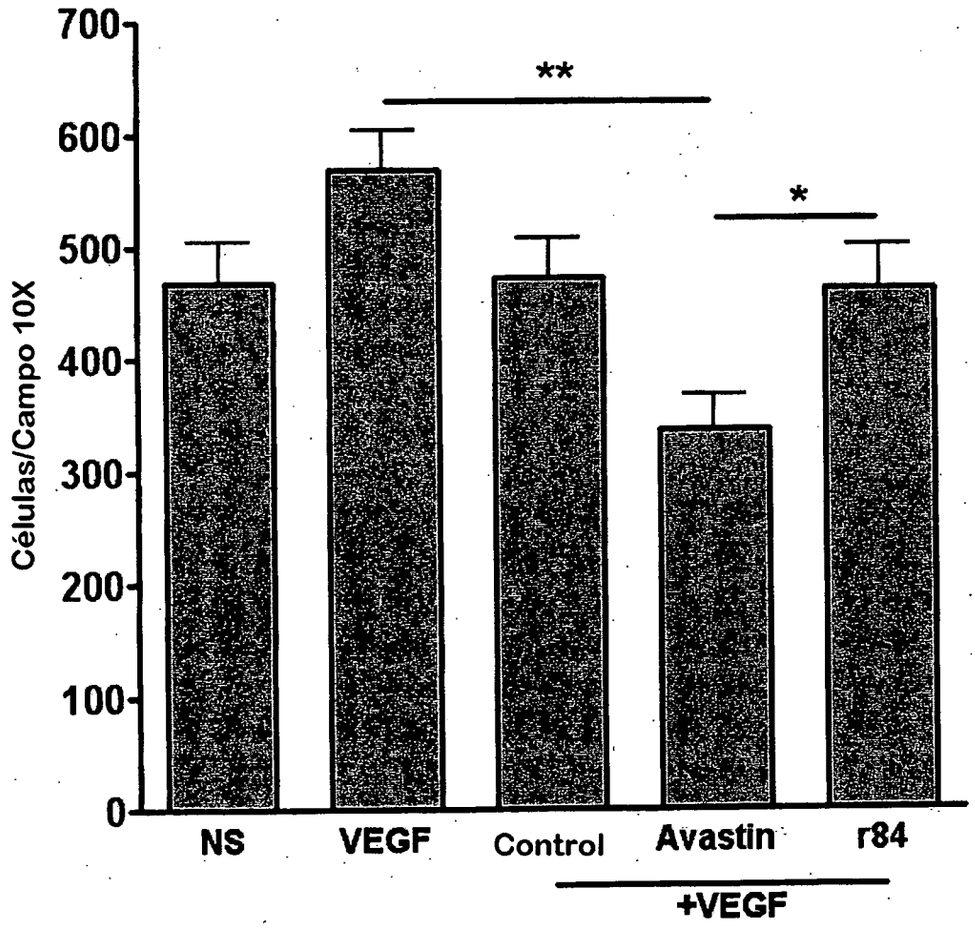

700
600
500
400
300
200
100
0
Células/Campo 10X
**
*
NS
VEGF
Control
Avastin
r84
+VEGF

Figura 22

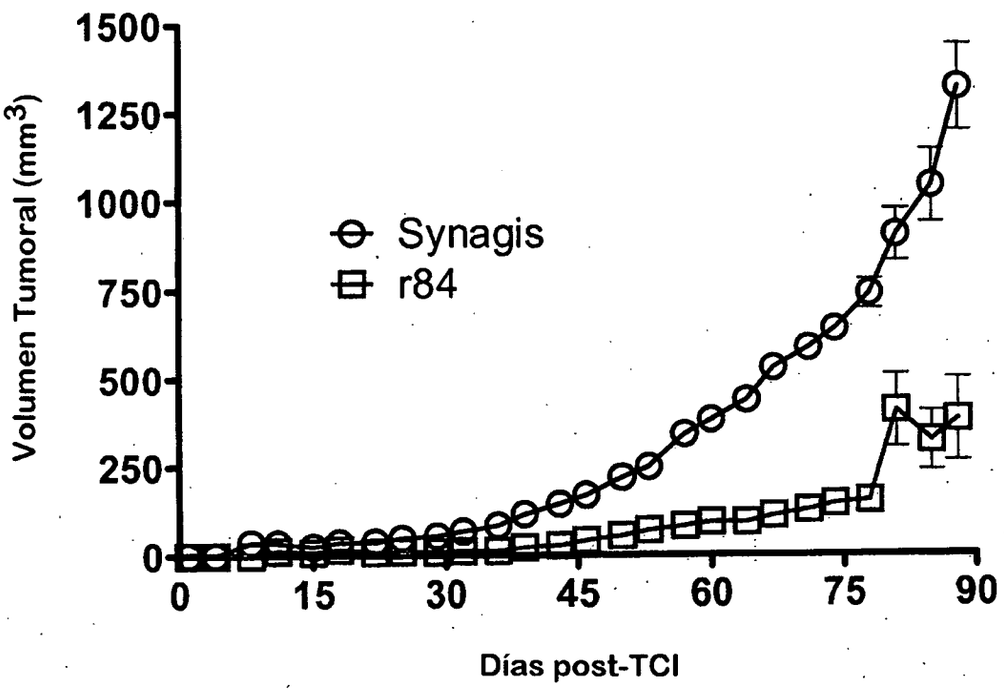

1500
1250
1000
750
500
250
0
Volumen Tumoral (mm3)
Synagis
r84
0
15
30
45
60
75
90
Días post-TCI

Figura 23

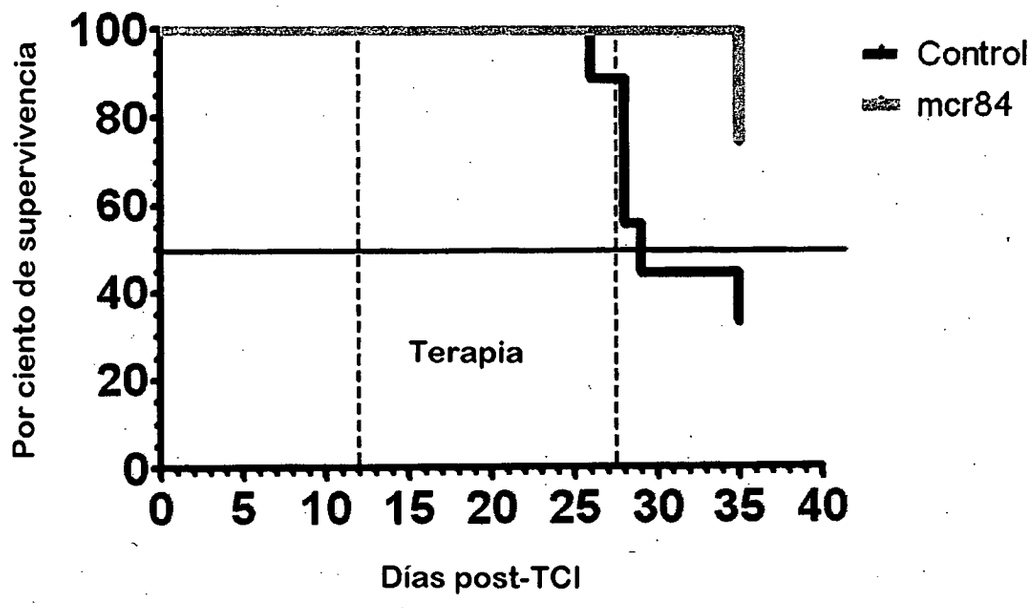

100
80
60
40
20
0
Por ciento de supervivencia
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Días post-TCI
Terapia
Control
mcr84

Figura 24

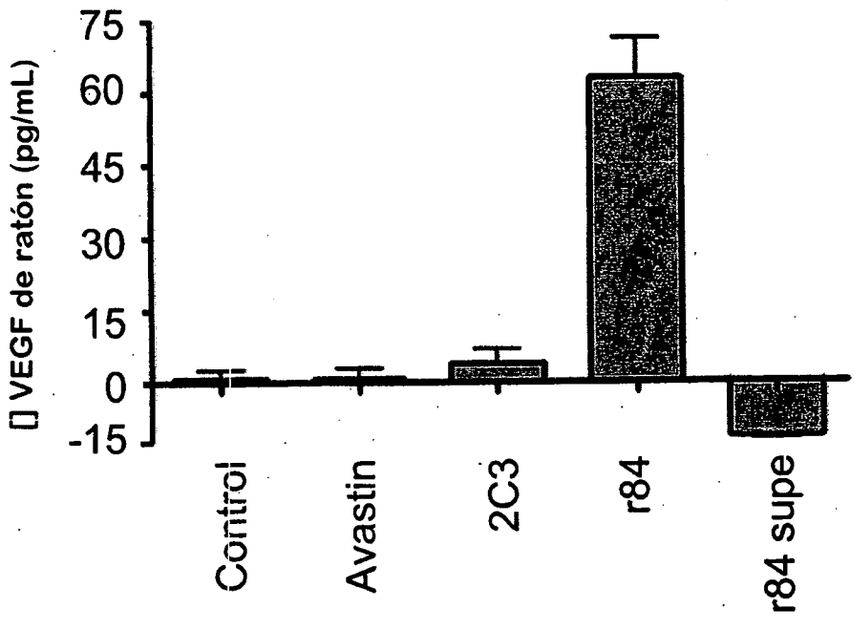
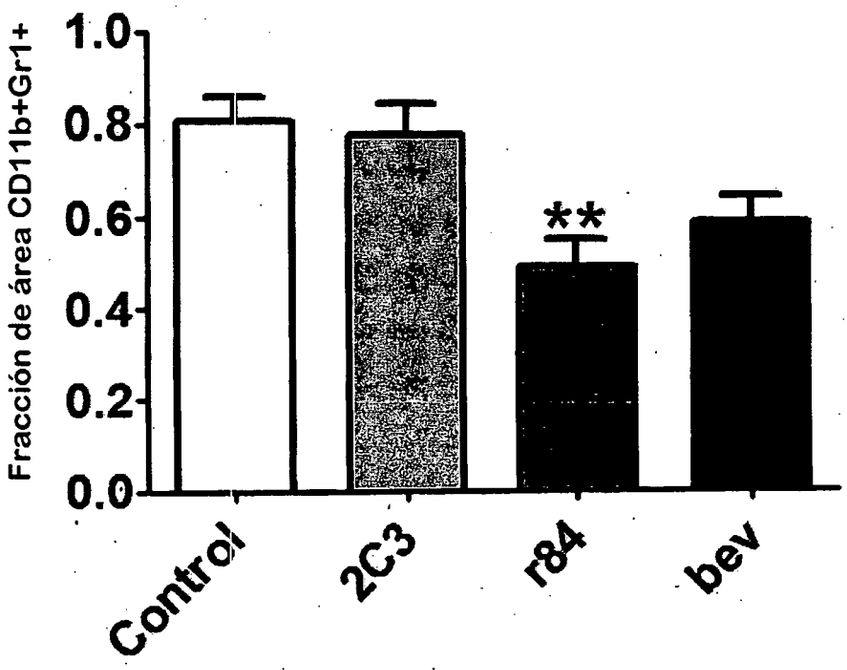

[] VEGF de ratón (pg/mL)
75
60
45
30
15
0
-15
Control
Avastin
2C3
r84
r84 supe

Figura 25


Fracción de área CD11b+Gr1+
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
Control
2C3
r84
bev

# LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Affitech AS
Peregrine Pharmaceuticals, Inc.

<120> COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y METODOS

<130> 69.93964/03

<140> PCT/GB2008/003745
<141> 2008-11-07

<150> US 60/987,015,
<151> 2007-11-09

<150> US 61/108,023,
<151> 2008-10-24

<150> US 61/106,047,
<151> 2008-10-16

<160> 34

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 378
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **dominio VH de anticuerpo**

<400> 1
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtga aacaatctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggacgt 300

tctatggttc ggggagtcat tataccttttt aacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 2
<211> 321
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **dominio VL de anticuerpo**

<400> 2
gacatccgga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 3
<211> 126
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **dominio VH de anticuerpo**

<400> 3

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Arg Ser Met Val Arg Gly Val Ile Ile Pro Phe Asn Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **dominio VL de anticuerpo**

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **CDR1 VH de anticuerpo**

<400> 5

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **CDR2 VH de anticuerpo**

<400> 6

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>

<223> **CDR3 VH de anticuerpo**

<400> 7

Gly Arg Ser Met Val Arg Gly Val Ile Ile Pro Phe Asn Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **CDR1 VL de anticuerpo**

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **CDR2 VL de anticuerpo**

<400> 9

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **CDR3 VL de anticuerpo**

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR1 VH de anticuerpo**

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR2 VH de anticuerpo**

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR3 VH de anticuerpo**

<400> 13

Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25 30

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR4 VH de anticuerpo**

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR1 VL de anticuerpo**

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR2 VL de anticuerpo**

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR3 VL de anticuerpo**

<400> 17

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **FR4 VL de anticuerpo**

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **ligador**

<400> 19

Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
1 5 10 15

Ser Glu Ala Arg Val
20

<210> 20
<211> 762
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **clon scFv completo**

<400> 20
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtga aacaatctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggacgt 300

tctatggttc ggggagtcat tatacctttt aacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctcaaa gctttcaggg agtgcatccg ccccaaaact tgaagaaggt 420

gaattttcag aagcacgcgt agacatccgg atgacccagt ctccatcctc cctgtctgca 480

tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta 540

aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcatccagt 600

ttgcaaagtg gggtcccatc aaggttcagt ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc 660

accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt 720

accccgctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aa 762

<210> 21
<211> 254
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **clon scFv completo**

<400> 21

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Arg Ser Met Val Arg Gly Val Ile Ile Pro Phe Asn Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Leu
115 120 125

Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu
130 135 140

Ala Arg Val Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
210 215 220

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser
225 230 235 240

Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250

<210> 22
<211> 1977
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena pesada de IgG**

<400> 22

caggtacagc ttgtgcagtc cggagccgag gtgaagaaac ccggagcatc agtgaaggtt 60

agctgcaagg catctggtgg gacattttcc tcctatgcca tctcctgggt tcggcaggct 120

cccggacagg gcctggagtg gatgggggg ttcgatcccg aagacggaga gaccatttac 180

gcacagaagt ttcagggtcg cgtgaccatg accgaggata cttctaccga cacagcatat 240

atggagctca gtagcttgcg ctccgaggac acggctgtat attactgtgc cactggacgg 300

agcatggtgc gcggggtaat catccctttc aacgggatgg atgtatgggg ccaagggacc 360

accgtgacag tcagctctgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc 420

tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 480

gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600

agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660

gacaagaaag ttggtgagag gccagcacag ggagggaggg tgtctgctgg aagccaggct 720

cagcgctcct gcctggacgc atcccggcta tgcagcccca gtccagggca gcaaggcagg 780

ccccgtctgc ctcttcaccc ggaggcctct gcccgcccca ctcatgctca gggagagggt 840

cttctggctt tttccccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc 900

tgcacacaaa ggggcaggtg ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggaccc 960

tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 1020

tctctcctcc cagattccag taactcccaa tcttctctct gcagagccca aatcttgtga 1080

caaaactcac acatgcccac cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc cctccagctc 1140

aaggcgggac aggtgcccta gagtagcctg catccaggga caggccccag ccgggtgctg 1200

acacgtccac ctccatctct cctcagcac ctgaactcct gggggggaccg tcagtcttcc 1260

tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg 1320

tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 1380

tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 1440

tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 1500

aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggtg 1560

ggacccgtgg ggtgcgaggg ccacatggac agaggccggc tcggcccacc ctctgccctg 1620

agagtgaccg ctgtaccaac ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1680

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1740

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1800

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1860

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1920

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatag 1977

<210> 23
<211> 645
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena ligera de IgG**

<400> 23
gacattcgga tgactcagtc tccctcctct ttgagcgctt ctgtgggcga tagggttact 60

atcacttgtc gagcctctca atccatcagc tcctacttga actggtacca gcagaaaccc 120

gggaaagcac ccaagctgct tatttacgcc gcctcctccc tgcaatccgg agtgccctcc 180

cggttcagcg gctccggctc tggaacagac tttaccctga ccatttcttc tttgcagcct 240

gaggattttg ctacttacta ctgtcagcag agttactcca ccccttgac attcggtggt 300

ggaacgaaag tagaaattaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 24
<211> 456
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena pesada de IgG**

<400> 24

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Arg Ser Met Val Arg Gly Val Ile Ile Pro Phe Asn Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 25
<211> 214
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena ligera de IgG**

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26
<211> 378
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **dominio VH de IgG**

<400> 26
caggtacagc ttgtgcagtc cggagccgag gtgaagaaac ccggagcatc agtgaaggtt 60

agctgcaagg catctggtgg gacattttcc tcctatgcca tctcctgggt tcggcaggct 120

cccggacagg gcctggagtg gatgggggg ttcgatcccg aagacggaga gaccatttac 180

gcacagaagt ttcagggtcg cgtgaccatg accgaggata cttctaccga cacagcatat 240

atggagctca gtagcttgcg ctccgaggac acggctgtat attactgtgc cactggacgg 300

agcatggtgc gcggggtaat catccctttc aacgggatgg atgtatgggg ccaagggacc 360

accgtgacag tcagctct 378

<210> 27
<211> 321
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **dominio VL de IgG**

<400> 27
gacattcgga tgactcagtc tccctcctct ttgagcgctt ctgtgggcga tagggttact 60

atcacttgtc gagcctctca atccatcagc tcctacttga actggtacca gcagaaaccc 120

gggaaagcac ccaagctgct tatttacgcc gcctcctccc tgcaatccgg agtgccctcc 180

cggttcagcg gctccggctc tggaacagac tttaccctga ccatttcttc tttgcagcct 240

gaggattttg ctacttacta ctgtcagcag agttactcca ccccctttgac attcggtggt 300

ggaacgaaag tagaaattaa g 321

<210> 28
<211> 78
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **marca c-myc y His**

<400> 28
gcggccgctg gatccgaaca aaagctgatc tcagaagaag acctaaactc acatcaccat 60

caccatcact aatctaga 78

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **marca c-myc y His**

<220>
<221> **marca de epítopo c-myc**
<222> (6)..(15)

<220>
<221> **marca de epítopo His**
<222> (18)..(23)

<400> 29

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

Ser His His His His His His
20

<210> 30
<211> 778
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **clon scFv completo inclusive sitios de restricción NcoI y NotI**

<400> 30
ccatggccca ggtgcagctg gtgcaatctg gggctgaggt gaagaagcct ggggcctcag 60

tgaaggtctc ctgcaaggct tctggaggca ccttcagcag ctatgctatc agctgggtgc 120

gacaggcccc tggacaaggg cttgagtgga tgggaggttt tgatcctgaa gatggtgaaa 180

caatctacgc acagaagttc cagggcagag tcaccatgac cgaggacaca tctacagaca 240

cagcctacat ggagctgagc agcctgagat ctgaggacac ggccgtgtat tactgtgcaa 300

caggacgttc tatggttcgg ggagtcatta tacctttaa cggtatggac gtctggggcc 360

aagggaccac ggtcaccgtc tcctcaaagc tttcagggag tgcatccgcc ccaaaacttg 420

aagaaggtga attttcagaa gcacgcgtag acatccggat gacccagtct ccatcctccc 480

tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgccg ggcaagtcag agcattagca 540

gctatttaaa ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg atctatgctg 600

catccagttt gcaaagtggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct gggacagatt 660

tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac tgtcaacaga 720

gttacagtac cccgctcact ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa gcggccgc 778

<210> 31
<211> 1368
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena pesada quimérica**

<400> 31
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtga aacaatctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggacgt 300

tctatggttc ggggagtcat tataccttt aacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctcacg cgccgatgct gcaccgactg tctatccact ggcccctgtg 420

tgtggagata caactggctc ctcggtgact ctaggatgcc tggtcaaggg ttatttccct 480

gagccagtga ccttgacctg gaactctgga tccctgtcca gtggtgtgca caccttccca 540

gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc 600

tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg gcccacccgg caagcagcac caaggtggac 660

aagaaagagc ccagagggcc cacaatcaag ccctgtcctc catgcaaatg cccagcacct 720

aacctcttgg gtggaccatc cgtcttcatc ttccctccaa agatcaagga tgtactcatg 780

atctccctga gccccatagt cacatgtgtg gtggtggatg tgagcgagga tgacccagat 840

gtccagatca gctggtttgt gaacaacgtg gaagtacaca cagctcagac acaaacccat 900

agagaggatt acaacagtac tctccgggtg gtcagtgccc tccccatcca gcaccaggac 960

tggatgagtg gcaaggagtt caaatgcaag gtcaacaaca aagacctccc agcgcccatc 1020

gagagaacca tctcaaaacc caaagggtca gtaagagctc cacaggtata tgtcttgcct 1080

ccaccagaag aagagatgac taagaaacag gtcactctga cctgcatggt cacagacttc 1140

atgcctgaag acatttacgt ggagtggacc aacaacggga aaacagagct aaactacaag 1200

aacactgaac cagtcctgga ctctgatggt tcttacttca tgtacagcaa gctgagagtg 1260

gaaaagaaga actgggtgga aagaaatagc tactcctgtt cagtggtcca cgagggtctg 1320

cacaatcacc acacgactaa gagcttctcc cggactccgg gtaaatga 1368

<210> 32
<211> 455
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena pesada quimérica**

<400> 32

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Arg Ser Met Val Arg Gly Val Ile Ile Pro Phe Asn Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Arg Ala
115 120 125

Asp Ala Ala Pro Thr Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr
130 135 140

Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser
180 185 190

Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys
195 200 205

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Glu Pro
210 215 220

Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
245 250 255

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
275 280 285

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
340 345 350

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
370 375 380

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
420 425 430

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
435 440 445

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455

<210> 33
<211> 642
<212> ADN
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena ligera quimérica**

<400> 33
gatatcagga tgacgcagag tccaagctct ctgtctgcct ctgtggggga cagggtgact 60

attacttgtc gggcatcaca gagtatctcc agctacctta attggtacca gcaaaagccc 120

ggcaaagccc ccaaattgct gatttacgca gccagctccc ttcagtctgg cgtccctagc 180

cgcttctccg ggagcggatc aggcacagac tttacgttga caatcagttc tctgcagccg 240

gaggattttg ccacttacta ctgtcaacag agctacagta cgcctctcac gtttggcggt 300

gggacaaagg tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccga ctgtgtccat cttcccacca 360

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 420

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 480

aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 540

ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 600

tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 642

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> **secuencia artificial**

<220>
<223> **cadena ligera quimérica**

<400> 34

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

113-937

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-067350- -00000-0000

Fecha: 2010-06-03 16:39:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

# LISTA DE CHEQUEO
## ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
AFFITECH RESEARCH AS

| REFERENCIA | | |
|---|---|---|
| | Radicación No. | 10 067350 |
| | Solicitud internacional | PCT/GB2008/003745 |
| | Fecha inicio fase nacional | 09/06/2010 |
| | Trámite | 11 |
| | Evento | 378 |
| | Actuación | 430 |
| | Oficio No. | 08742 |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...



Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 JUL. 2010.
adpa11



Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Linea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co