

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-046124- -00000-0000

Fecha: 2013-03-07 16:24:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-VEGFR-3.

SOLICITANTE: IMCLONE, LLC

DIRECCIÓN: 440 Route 22 East, Bridgewater, New Jersey 08807.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 07 de marzo de 2013

P2013/000027

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000027

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: IMCLONE, LLCDirección: 440 Route 22 East, Bridgewater,
New Jersey 08807.Nacionalidad o Domicilio: EstadounidenseLugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: Carrera 5 No. 34-03 BogotáTeléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747BtaTP 74.295INVENTOR (ES)
(72)Nombre: (1) Bronislaw PYTOWSKI; (2) Krishnadatt PERSAUD; (3) Nathalie ZAYEK.Dirección: (1); (2) y (3) Eli Lilly And Company, P.O. Box 6288,
Indianapolis, Indiana 46206-6288.Nacionalidad o Domicilio: (1); (2) y (3) Estadounidense.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/050131 Fecha Septiembre 01, 2011Publicación Internacional No. WO 2012/033696 A1 Fecha Marzo 15, 2012

6

Título (54) COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-VEGFR-3.Clasificación Internacional (51) C07K 16/28.

Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 07, 2010

(31) Número de Solicitud

61/380,432

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 08-110.817



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



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 del 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 12 x 12.



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.



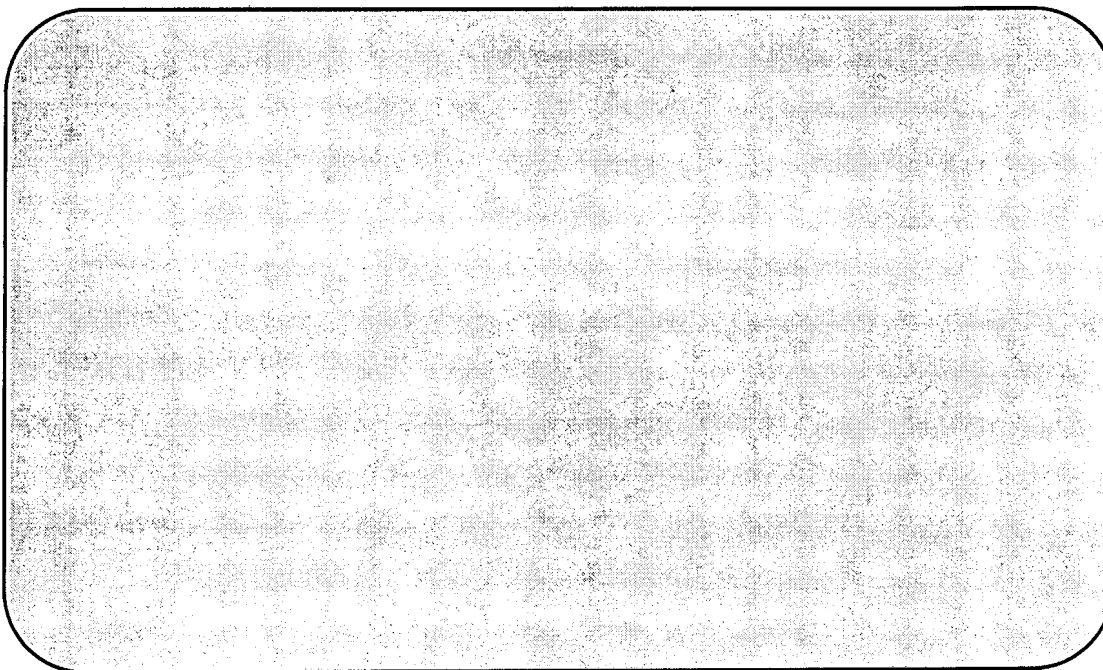
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0020751

Bogotá D.C., Febrero 28 de 2013 - 16:07:32

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

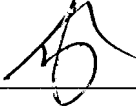
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181982212	28/02/2013	9.174.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-046124- -00000-0000

Fecha: 2013-03-07 16:24:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 28 de 2013 - 16:07:35



No. 13-046124- -00000-0000

Fecha: 2013-03-07 16:24:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

EO
S CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

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 INVENCION 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		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____/ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1			
2	13-46124-0		
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
Anexos CD

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application IMCLONE LLC is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from PYTOWSKI, Bronislaw to IMCLONE LLC, dated 21 July 2011 (21.07.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from PERSAUD, Krishnadatt to IMCLONE LLC, dated 21 July 2011 (21.07.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from ZAYEK, Nathalie to IMCLONE LLC, dated 16 August 2011 (16.08.2011)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
15 March 2012 (15.03.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/033696 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/050131

(22) International Filing Date:
1 September 2011 (01.09.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/380,432 7 September 2010 (07.09.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **IM-CLONE LLC** [US/US]; 440 Route 22 East, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **PYTOWSKI, Bronislaw** [US/US]; c/o ELI LILLY AND COMPANY, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **PER-SAUD, Krishnadatt** [US/US]; c/o ELI LILLY AND COMPANY, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **ZAYEK, Nathalie** [US/US]; c/o ELI LILLY AND COMPANY, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(74) Agents: **HASON, Averie K.** et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ANTI-VEGFR-3 ANTIBODY COMPOSITIONS

(57) Abstract: The present invention provides anti-VEGFR-3 monoclonal antibodies, pharmaceutical compositions containing said antibodies and uses of said antibodies in the treatment of disease.



WO 2012/033696 A1

-1-

ANTI-VEGFR-3 ANTIBODY COMPOSITIONS

This invention is directed to antibodies that bind specifically to Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3), particularly provided herein are amino acid and nucleic acid sequences of anti-VEGFR-3 antibodies, pharmaceutical compositions, and uses of said antibodies in methods of treating a medical condition mediated by VEGFR-3.

Endothelial cell specific growth factors and receptors are believed to be primarily responsible for the stimulation of endothelial cell growth, differentiation, as well as certain cellular functions. One widely studied family of growth factors comprises Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs).

VEGFR-3 is the only receptor tyrosine kinase (RTK) whose expression in normal adult tissues is largely restricted to the lymphatic endothelium. Nascent VEGF-C and VEGF-D specifically bind to VEGFR-3. Proteolytic cleavage of the N- and C-terminal regions of these proteins liberate mature VEGF-C_{ΔNAC} and VEGF-D_{ΔNAC}, which acquire increased affinity for VEGFR-3. These ligands activate VEGFR-3 signaling and initiate lymphangiogenesis (i.e. the formation of new lymphatic vessels from pre-existing lymphatic vessels).

The pattern of expression of the ligands for VEGFR-3 suggests their involvement not only in the development and maintenance of the normal vascular system but also in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. Further, VEGFR-3 expression has been detected on blood capillaries within tumors. Thus monoclonal antibodies (mAbs) that inhibit the binding of VEGF-C and/or VEGF-D to VEGFR-3 have the potential to inhibit tumour angiogenesis.

In addition, blocking VEGFR-3 activity has been shown to inhibit VEGF-C – enhanced tumour lymphangiogenesis. In many types of cancer, the first site of metastasis is the lymph nodes and therefore blocking VEGFR-3 has the potential to inhibit tumour metastases.

Persaud, *et al.*, J. Cell Science 117:2745-56 (2004), describes certain properties of a human anti-VEGFR-3 monoclonal antibody, but does not disclose the sequence of any such antibodies nor the epitopes that such antibodies may bind. There remains a need

-2-

therefore for high affinity anti-VEGFR-3 antibodies that bind novel epitopes within VEGFR-3 and which are able to block ligand binding and receptor activation. There further remains a need for anti-VEGFR-3 antibodies which are able to demonstrate anti-tumour efficacy against a variety of tumour types, without significant negative side effects.

The present invention provides an antibody, or antigen binding portion thereof, that binds to human VEGFR-3 wherein:

a) the binding of said antibody to human VEGFR-3 is reduced by at least 90% by singly mutating Pro-219 of human VEGFR-3 to Leu; and

b) the binding of said antibody to human VEGFR-3 is reduced by at least 50% by singly mutating Val-175 of human VEGFR-3 to Ala.

Preferably, the level of binding between the antibody, or antigen-binding fragment thereof, and the human or mutant VEGFR-3 is assayed by expressing the soluble extracellular domain of the human or mutant VEGFR-3 as a fusion protein with alkaline phosphatase and then determining the amount of each fusion protein that is able to bind to the antibody using an alkaline phosphatase chemiluminescence assay.

The invention further provides a pharmaceutical composition comprising an antibody, or antigen binding portion thereof, of the present invention together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In addition, the invention provides a pharmaceutical composition comprising an antibody, or antigen binding portion thereof, of the present invention together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient and optionally contains at least one other therapeutic ingredient.

The invention also provides an antibody, or antigen binding portion thereof, of the invention for use as a medicament.

The invention additionally provides an antibody, or antigen binding portion thereof, of the invention for use in the treatment or prevention of ovarian cancer, human erythroleukaemia, head and neck cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, lung cancer, colon cancer and lymph node metastases.

The invention further provides a method of treating a cancer selected from the group consisting of ovarian cancer, human erythroleukaemia, head and neck cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, lung cancer, colon cancer and

-3-

lymph node metastases in a mammal, comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of an antibody, or antigen binding portion thereof, of the invention.

The invention additionally provides a use of an antibody, or antigen binding
5 portion thereof, in the manufacture of a medicament for the treatment of a cancer selected from the group consisting of ovarian cancer, human erythroleukaemia, head and neck cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, lung cancer, colon cancer and lymph node metastases.

The invention also provides an antibody, or antigen binding portion thereof, of the
10 invention in combination with a further anti-cancer agent selected from cisplatin, 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and docetaxel for simultaneous, separate or sequential use in therapy.

The invention additionally provides a method of treating a cancer selected from the group consisting of ovarian cancer, human erythroleukaemia, head and neck cancer,
15 breast cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, lung cancer, colon cancer and lymph node metastases in a mammal, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective combination of an antibody, or antigen binding portion thereof, of the invention and a further anti-cancer agent selected from cisplatin, 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and docetaxel.

20 The antibodies of the present invention bind the second immunoglobulin (Ig)-like domain of a mammalian VEGFR-3. The second Ig-like domain of human VEGFR-3 corresponds to residues 138 to 226 of the full length receptor. *See, Pajusola, et. al., Cancer Res. 52:5738-5743 (1992).*

The term "second Ig-like domain of a mammalian/human/mouse VEGFR-3" (and
25 variations thereof) is intended to encompass naturally occurring forms of the domain (*e.g.*, purified from a cell that expresses the domain under normal conditions) as well as recombinant versions, *e.g.*, encoded by naturally occurring or synthetic point mutants or truncated versions thereof.

The antibodies of the present invention bind an epitope in the second Ig-like
30 domain of human VEGFR-3 wherein P219 is the dominant constituent of the epitope, V175 is a subordinate constituent of the epitope and L221 is a minor constituent of the epitope. (The numbering of these residues is consistent with the full-length human

-4-

VEGFR-3, as reported in Pajusola, *et. al., supra*, and EMBL database, accession number X 68203.) This finding is based in part on the observation that including the mutations V175A or P219L or L221V (i.e. substituting the orthologous murine VEGFR-3 residues) in human VEGFR-3 abolishes or significantly reduces the binding of antibodies of the present invention to the mutant human VEGFR-3.

Moreover, the antibodies of the present invention that bind an epitope in human VEGFR-3 (wherein P219 is the dominant constituent of the epitope, V175 is a subordinate constituent of the epitope and L221 is a minor constituent of the epitope) are able to block the binding of the ligand VEGF-C to VEGFR-3 and thus neutralise the activity of the receptor. Accordingly, the present invention provides a novel, neutralising epitope on human VEGFR-3 that allows the production of novel neutralising antibodies to human VEGFR-3, which are able to block the binding of human VEGF-C to the receptor. The invention thus provides an epitope of human VEGFR-3 wherein P219 is the dominant constituent of the epitope, V175 is a subordinate constituent of the epitope and L221 is a minor constituent of the epitope.

The invention also provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds an epitope of human VEGFR-3 comprising the amino acid residues P219 and V175. Preferably the invention also provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds an epitope of human VEGFR-3 comprising the amino acids P219, V175 and L221. Such an epitope is bound by antibodies of the present invention (e.g. Antibody 1) and therefore the invention also provides an antibody, or antigen-binding portion thereof that reacts with the same epitope of human VEGFR-3 as an antibody having a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 and a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16. An antibody reacting with the same epitope of human VEGFR-3 as certain antibodies of the present invention (e.g. Antibody 1) would compete for binding to human VEGFR-3 and accordingly the invention also provides an antibody, or antigen-binding portion thereof that competes with an antibody having a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 and a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16 for binding to human VEGFR-3.

Preferably, an antibody of the present invention also binds to a mutant mouse VEGFR-3 having the sequence shown in SEQ ID NO: 20 (which includes the mutation L219P) and a mutant mouse VEGFR-3 having the sequence shown in SEQ ID NO: 21

-5-

(which includes the mutation A175V) wherein the binding to the mutant mouse VEGFR-3 having the sequence shown in SEQ ID NO: 20 is increased by more than 50-fold when compared with the binding to wild type mouse VEGFR-3 (SEQ ID NO: 19) and the binding to the mutant mouse VEGFR-3 having the sequence shown in SEQ ID NO: 21 is increased by more than 10-fold when compared with the binding to wild type mouse VEGFR-3.

Preferably the level of binding between the antibody, or antigen-binding fragment thereof, and the wild type mouse or mutant mouse VEGFR-3 is assayed by expressing the soluble extracellular domain of the wild type mouse or mutant mouse VEGFR-3 as a fusion protein with alkaline phosphatase and then determining the amount of each fusion protein that is able to bind to the antibody using an alkaline phosphatase chemiluminescence assay.

Preferably, an antibody of the present invention, or antigen-binding portion thereof, has a high affinity for human VEGFR-3. For example, an antibody, or antigen-binding portion thereof, that has a K_d of between 1×10^{-9} M and 5.6×10^{-11} M for human VEGFR-3 as measured by surface plasmon resonance on a BIACORE® 2000 biosensor at 20°C. More preferably the antibody, or antigen-binding portion thereof, has a K_d of between 1×10^{-10} M and 5.6×10^{-11} M for human VEGFR-3 as measured by surface plasmon resonance on a BIACORE® 2000 biosensor at 20°C.

Preferably, the present invention provides an anti-VEGFR-3 antibody, or antigen-binding portion thereof, that inhibits the binding of human VEGF- $C_{\Delta N\Delta C}$ to human VEGFR-3 with an IC_{50} of between 2 nM and 1.3 nM.

Preferably, the present invention provides an anti-VEGFR-3 antibody, or antigen-binding portion thereof, that inhibits the VEGF- $C_{\Delta N\Delta C}$ stimulated mitogenic response with an IC_{50} of between 10 nM and 5 nM. More preferably the antibody, or antigen-binding portion thereof, inhibits the VEGF- $C_{\Delta N\Delta C}$ stimulated mitogenic response with an IC_{50} of between 8 nM and 5 nM, most preferably between 6 nM and 5 nM in an assay as described in Example 5.

Preferably, the present invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds human VEGFR-3 and which comprises a light chain variable region (LCVR) and a heavy chain variable region (HCVR), wherein the LCVR comprises

-6-

complementarity determining regions (CDRs) LCDR1, LCDR2, and LCDR3 and the HCVR comprises CDRs HCDR1, HCDR2 and HCDR3, wherein LCDR1 comprises the amino sequence of SEQ ID NO: 1, LCDR2 comprises the polypeptide of SEQ ID NO: 2, LCDR3 comprises the polypeptide of SEQ ID NO: 3, HCDR1 comprises the polypeptide of SEQ ID NO: 6, HCDR2 comprises the polypeptide of SEQ ID NO: 7 and HCDR3 comprises the polypeptide of SEQ ID NO: 8.

More preferably, the present invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds human VEGFR-3 and that comprises an LCVR polypeptide of SEQ ID NO: 5 and an HCVR polypeptide of SEQ ID NO: 10.

10 More preferably, the present invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds human VEGFR-3 and that comprises a light chain comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 15 and a heavy chain comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 16.

15 Still more preferably, the present invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds human VEGFR-3 and that comprises two light chains comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 15 and two heavy chain comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 16.

Preferably, the invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof that competes with an antibody of the invention for binding to human VEGFR-3.

20 Preferably, the invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that is a human antibody.

Preferably, the invention provides an antibody, or antigen-binding portion thereof, that is a human-engineered antibody.

25 **Definitions**

The term "antibody" as used herein is intended to refer to monoclonal antibodies which may be fully human antibodies or human engineered antibodies, as well as digestion fragments, specified portions and variants thereof, including antibody mimetics, portions of antibodies that mimic the structure and/or function of an antibody or specified fragment or portion thereof, including single chain antibodies and fragments thereof, that retain the ability to bind to the second Ig-like domain of human VEGFR-3. For example, antibody fragments capable of specifically binding the second Ig-like domain of human

30

-7-

VEGFR-3 embraced by the present invention include Fab fragments (*e.g.*, by papain digestion), a Facb fragment (*e.g.*, by plasmin digestion), F(ab')₂ fragments (*e.g.* by pepsin digestion) and disulphide-stabilised variable fragments (dsFv) or single chain variable fragments (scFv) generated by molecular biology techniques. Antibody fragments are
5 also intended to include, *e.g.*, domain deleted antibodies, diabodies and triabodies that retain the ability to bind to the second Ig-like domain of human VEGFR-3.

Antibodies include immunoglobulin molecules comprising four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as
10 HCVR) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region contains three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as LCVR) and a light chain constant region. The light chains of antibodies from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, named kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of
15 their constant domains. The expression LCVR, as used herein, is intended to include both the variable regions from kappa-type light chains (V κ) and the variable regions from lambda-type light chains (V λ). The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The HCVR and LCVR regions include regions of sequence hypervariability, termed complementarity determining regions (CDRs), interspersed with
20 regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each HCVR and LCVR is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. For purposes of the present invention, the LCVR CDRs are abbreviated LCDR1, LCDR2 and LCDR3, and the HCVR CDRs are abbreviated HCDR1, HCDR2 and HCDR3.

25 Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, antibodies can be assigned to different classes. There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM. Several of these may be further divided into subclasses (isotypes), *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called alpha
30 (α), delta (Δ), epsilon (ϵ), gamma (γ), and mu (μ), respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well

-8-

known. The present invention includes antibodies that fall into any of the aforementioned classes or subclasses (isotypes).

As used herein, a "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *e.g.*, the individual antibodies comprising the population are substantially identical except for possible naturally occurring mutations or minor post-translational variations that may be present. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site (also known as determinant or epitope), which as taught herein are contained in the second Ig-like domain of a mammalian VEGFR-3. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants, each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method.

As used herein, a "human antibody" refers to antibodies having variable and constant regions corresponding to human germline immunoglobulin sequences (as described in Kabat, *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). The term "human antibody," as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

Modifications to the amino acid sequence of Antibody 1 as disclosed herein are included within the scope of the present invention, particularly in connection with improvements in the binding affinity and/or other biological properties of the antibodies. In this context, the term "human engineered antibody", as used herein, refers to additional antibodies that have similar functional properties to Antibody 1 (*e.g.* the ability to bind human VEGFR-3 at an epitope comprising P219 and V175) and which have framework regions that are substantially human or fully human surrounding CDRs that are derived from Antibody 1. Substantially human frameworks in the context of the present invention are those that have at least 80% sequence identity to the framework regions of Antibody 1. Preferably, such substantially human frameworks have at least about 85%, about 90%,

-9-

about 95%, or about 99% sequence identity to the framework regions of Antibody 1.

Human germline sequences are described in WO 2007/044411. For example, germline light chain frameworks may be selected from the group consisting of: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L15, L6, L8, O12, O2, and O8 and germline

5 heavy chain framework regions may be selected from the group consisting of: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VH1-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VH1-18, VH1-69, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, and VH5-51.

Human engineered antibodies derived from Antibody 1 may include deletions
10 from and/or insertions into and/or substitutions of residues within the sequence of Antibody 1. However, the final construct must retain the desired functional characteristics of Antibody 1 (e.g. the ability to bind human VEGFR-3 at an epitope comprising P219 and V175).

Human engineered antibodies having similar functional properties to Antibody 1
15 can be generated using several different approaches, with each approach starting with Antibody 1 (i.e. an antibody having LCVR and HCVR sequences as shown in SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 10 respectively) as a template or parent antibody to make additional antibodies. In a first approach, the CDRs of Antibody 1 are grafted into a different human framework that has a high sequence identity with the framework regions
20 of Antibody 1. The sequence identity of the new framework will generally be at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99% identical with the corresponding framework in Antibody 1. This grafting may result in a reduction in binding affinity compared to Antibody 1. If this is the case, the framework can be back-mutated to the framework of Antibody 1 at certain positions based on specific criteria
25 published by Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991). The identification of residues to consider for back-mutation may be carried out as follows: When an amino acid falls under any of the following categories, the framework amino acid of the human germline sequence that is being used (acceptor framework) is replaced by a framework amino acid from the framework of Antibody 1 (donor framework):

30 (a) the amino acid in the human framework region of the acceptor framework is unusual for human frameworks at that position, whereas the corresponding amino acid in Antibody 1 is typical for human frameworks at that position;

-10-

(b) the position of the amino acid is immediately adjacent to one of the CDRs;

or

(c) any side chain atom of a framework amino acid is within about 5-6 angstroms (centre-to-centre) of any atom of a CDR amino acid in a three dimensional immunoglobulin model.

When each of the amino acids in the human framework region of the acceptor framework and the corresponding amino acid in the Antibody 1 framework is unusual for human frameworks at that position, such an amino acid may be replaced by an amino acid typical for human frameworks at that position. These back-mutation criteria enable one to recover the activity of Antibody 1.

In a second approach, human engineered antibodies derived from Antibody 1 which retain the functional properties of Antibody 1, (e.g. the ability to bind human VEGFR-3 at an epitope comprising P219 and V175), can be generated by mutating the CDRs of Antibody 1 (either randomly or in a biased fashion to avoid degeneracy of the amino acid code) whilst retaining the framework regions of Antibody 1. Preferably, the mutations (deletions, insertions and/or substitutions) in the amino acid sequences of the CDRs of human engineered antibodies derived from Antibody 1 are limited to a maximum of three mutations, more preferably two mutations or most preferably a single mutation in the CDR sequences of the human engineered antibody when compared with the CDR sequences of Antibody 1. Where more than one mutation is present, the mutations may be distributed across the CDR sequences in a variety of different ways. For example, all of the mutations may occur in a single CDR sequence (e.g. LCDR1), each mutation may occur in a different CDR sequence or two mutations may be found in one CDR sequence and a third mutation found in another CDR sequence. This results in the creation of a combinatorial library of human engineered antibodies, wherein the CDR sequences are mutated at one or more positions as described above, whilst retaining the framework regions of Antibody 1. The library can be screened for additional variants that have similar or improved functional properties when compared with Antibody 1.

A further approach to generate human engineered antibodies derived from Antibody 1 (and which retain the functional properties of Antibody 1, e.g. the ability to bind human VEGFR-3 at an epitope comprising P219 and V175) is to combine the two approaches described above and make changes in both the frameworks and the CDRs. In

-11-

other words, after grafting the CDRs of Antibody 1 into a different framework, specific framework residues may be back-mutated in addition to making changes in the CDRs. The general principle of this methodology is described in Wu et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 294: 151-162.

5 The amino acid changes also may alter post-translational processes of the human engineered antibodies, such as changing the number or position of glycosylation sites.

 Substitution variants may be generated by substituting one or more hyper-variable region residues of Antibody 1. One such method for generating substitutional variants is known as affinity maturation using phage display. Several hypervariable region sites
10 (e.g., 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g., binding affinity) as disclosed herein.

15 The assays disclosed herein can be used to screen human engineered antibodies derived from Antibody 1 to identify those antibodies having the *in vitro* and *in vivo* functions as disclosed herein.

 The antibodies of the present invention may be isolated antibodies. An isolated antibody is substantially free of other cellular material and/or chemicals.

20 The term “epitope”, as used herein, refers to a particular molecular region on the surface of an antigen capable of eliciting an immune response and of binding to the specific antibody produced by such a response. An epitope may be a linear epitope (i.e. composed of contiguous amino acid residues all contained within a single short stretch of sequence) or it may be a conformational epitope (i.e. composed of amino acid residues
25 that are in disparate parts of the linear sequence of the antigen, but which are brought together to form the antibody binding site once the antigen assumes its appropriate secondary and tertiary structure). Typically, an epitope is constituted of a small number (e.g. 2 to 5) of key amino acid residues and disruption of those residues (e.g. by mutation to a different amino acid residue) results in a significant reduction or even complete
30 abolition of the binding between the antigen and the epitope.

 Antibodies or antigen-binding fragments thereof that “compete” with the molecules disclosed herein are those that bind human VEGFR-3 at site(s) that are

-12-

identical to, or overlapping with, the site(s) at which the present molecules bind.

Competing human engineered antibodies or antigen-binding fragments thereof can be identified, for example, via an antibody competition assay. For example, a sample of purified or partially purified human VEGFR-3 is bound to a solid support. An antibody

5 of the present invention and a test monoclonal antibody or antigen-binding fragment, with either the test or antibody of the present invention labelled, are then added. If the labelled antibody and the unlabeled antibody bind to separate and discrete sites on VEGFR-3, the labelled antibody will bind to the same level whether or not the suspected competing antibody is present. However, if the sites of interaction are identical or overlapping, the
10 unlabeled antibody will compete, and the amount of labelled antibody bound to the antigen will be lowered. If the unlabelled antibody is present in excess, no labelled antibody will bind. For purposes of the present invention, competing human engineered antibodies or antigen-binding fragments thereof are those that decrease the binding of the present antibodies by about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 85%, about
15 90%, about 95%, or about 99%. Details of procedures for carrying out such competition assays are well known in the art and can be found, for example, in Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pages 567-569, ISBN 0-87969-314-2. Such assays can be made quantitative by using purified antibodies. A standard curve is established by
20 titrating one antibody against itself, i.e., the same antibody is used for both the label and the competitor. The capacity of an unlabeled competing monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof to inhibit the binding of the labeled molecule to the plate is titrated. The results are plotted, and the concentrations necessary to achieve the desired degree of binding inhibition are compared.

25 Human VEGFR-3 exists in two forms, which are generated by mRNA transcripts of differing length. The longer transcript encodes a protein containing 65 extra amino acid residues at the C terminus when compared with the protein encoded by the shorter transcript, with the longer protein being the major form detected in tissues. The two variants are identical in their N-terminal extracellular domains. The term "human
30 VEGFR-3", unless otherwise stated, refers to both variants of wild type human VEGFR-3 (i.e. SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18) that are derived from the alternate mRNA transcripts.

-13-

The nucleic acid and corresponding amino acid sequences of the LCVR region of Antibody 1 are designated as SEQ ID NOS: 4 and 5 respectively.

The nucleic acid and corresponding amino acid sequences of the HCVR region of Antibody 1 are designated herein as SEQ ID NOS: 9 and 10 respectively.

5 The nucleic acid and corresponding amino acid sequences of the light chain of Antibody 1 are designated herein as SEQ ID NOS: 11 and 12 respectively. Amino acid residues 1-19 of SEQ ID NO: 12 constitute a secretory sequence useful in expression and extraction of the light chain from various mammalian host cell lines, but which is not present in the mature antibody. The amino acid sequence of the mature light chain of
10 Antibody 1 is designated herein as SEQ ID NO: 15.

 The nucleic acid and corresponding amino acid sequences of the heavy chain of Antibody 1 are designated as SEQ ID NOS: 13 and 14 respectively. As in the case of the sequence for the light chain, amino acid residues 1-19 of SEQ ID NO: 14 constitute a secretory sequence useful in expression and extraction of the heavy chain from various
15 mammalian host cell lines, but which is not present in the mature antibody. The amino acid sequence of the mature heavy chain of Antibody 1 is designated herein as SEQ ID NO: 16.

 Specificity of an antibody can be determined based on affinity and/or avidity. Affinity, represented by the equilibrium constant for the dissociation of an antigen with
20 an antibody (K_d), measures the binding strength between an antigenic determinant and an antibody-binding site. Avidity is the measure of the strength of binding between an antibody with its antigen. Avidity is related to both the affinity between an epitope with its antigen binding site on the antibody, and the valence of the antibody, which refers to the number of antigen binding sites of a particular epitope. The lesser the value of the K_d ,
25 the stronger the binding strength between an antigenic determinant and the antibody binding site.

 The present invention also provides a polynucleotide that encodes a heavy chain of an antibody of the present invention (e.g. Antibody 1 – SEQ ID NO: 13), or polynucleotides that comprise any one of the VH regions or a portion thereof, or any one
30 of the VH CDRs, including any variants thereof, of an antibody of the present invention (e.g. Antibody 1). The present invention also provides a polynucleotide that encodes a light chain of an antibody of the present invention (e.g. Antibody 1 – SEQ ID NO: 11), or

-14-

polynucleotides that comprise any one of the VL regions or a portion thereof, or any one of the VH CDRs, including any variants thereof, of an antibody of the present invention (e.g. Antibody 1).

The invention also includes expression vectors comprising any of the

5 polynucleotides described herein. Exemplary vectors include plasmids, phagemids, cosmids, viruses and phage nucleic acids or other nucleic acid molecules that are capable of replication in a prokaryotic or eukaryotic host such as a cell, *e.g.*, a mammalian cell. Typical expression vectors contain transcription and translation terminators, initiation sequences, and promoters useful for regulation of the expression of the nucleic acid

10 molecules of the invention. The vectors may also contain genetic expression cassettes containing an independent terminator sequence, sequences permitting replication of the vector in both eukaryotes and prokaryotes, *i.e.*, shuttle vectors and selection markers for both prokaryotic and eukaryotic systems. The vectors typically contain a marker to provide a phenotypic trait for selection of transformed hosts such as conferring resistance

15 to antibiotics such as ampicillin or neomycin.

Suitable promoters include constitutive promoters and inducible promoters. Representative expression control sequences/promoters include the *lac* system, the *trp* system, the *tac* system, the *trc* system, major operator and promoter regions of phage lambda, the control region of *fd* coat protein, the glycolytic promoters of yeast, *e.g.*, the

20 promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of yeast acid phosphatase, *e.g.*, *Pho5*, the promoters of the yeast alpha mating factors, promoters derived from the human cytomegalovirus, metallothionine promoter, murine mammary tumor virus promoter, Rous sarcoma virus promoter, polyhedrin promoter and promoters derived from polyoma, adenovirus, retrovirus, and simian virus, *e.g.*, the early and late promoters of SV40.

25 The invention also includes non-human hosts such as cells containing a polynucleotide or a vector of the invention. By "host" it is meant a non-human multicellular organism or a "host cell", which refers to a cell or population of cells into which a polynucleotide or vector of the invention is introduced. A host cell of the present invention may be a eukaryotic cell or cell line, such as a plant, animal, vertebrate,

30 mammalian, rodent, mouse, primate, or human cell, or cell line. Suitable eukaryotic cells include yeast and other fungi, insect cells, plant cells, human cells, and animal cells, including mammalian cells, such as hybridoma lines, COS cells, NS0 cells and CHO

-15-

cells. By "a population of host cells," it is meant a group of cultured cells into which a polynucleotide or vector of the present invention can be introduced and expressed. Any host cells which will support expression from a polynucleotide or vector of the invention is intended.

5 A host of the present invention may also be prokaryotic. Suitable prokaryotic hosts include, for example, *E. coli*, such as *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI, and *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, such as *Bacillus subtilis*, and *Streptomyces*.

10 The invention also includes methods of producing an antibody of the present invention, which entails culturing a host cell expressing one or more polynucleotides encoding an antibody of the present invention, and recovering the antibody from the culture medium.

15 The antibodies of the present invention can be used as medicaments in human medicine, administered by a variety of routes. Most preferably, pharmaceutical compositions comprising the antibodies of the present invention are for parenteral administration. Such pharmaceutical compositions can be prepared by methods well known in the art (*See, e.g., Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.) and comprise an antibody as disclosed herein, and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient.

20 As used herein, the terms "inhibit" or "neutralize" with respect to a bioactivity of an antibody of the invention means the ability to substantially antagonize, prohibit, prevent, restrain, slow, disrupt, eliminate, stop, reduce or reverse a bioactivity of human VEGFR-3, including, but not limited to, a human VEGFR-3 bioactivity as measured in Example 4 or 5 herein.

25 As used herein, the terms "treat" and "treatment" refer to therapeutic treatment, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) an undesired physiological change associated with a disease or disorder. Beneficial or desired clinical results include alleviation of symptoms, diminishment of the extent of a disease or disorder, stabilization of a disease or disorder (*i.e.*, where the disease or disorder does not worsen), delay or
30 slowing of the progression of a disease or disorder, amelioration or palliation of the disease or disorder, and remission (whether partial or total) of the disease or disorder, whether detectable or undetectable. "Treatment" can also mean prolonging survival as

-16-

compared to expected survival if not receiving treatment. Those in need of treatment include those already with the disease or disorder as well as those prone to having the disease or disorder.

The compositions of the invention may include a "therapeutically effective
5 amount" of an antibody of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A
10 therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects.

Therapy may be "first-line", *i.e.*, as an initial treatment in patients who have had no prior anti-cancer treatments, either alone or in combination with other treatments; or "second-line", as a treatment in patients who have had one prior anti-cancer treatment
15 regimen, either alone or in combination with other treatments; or as "third-line", "fourth-line", etc. treatments, either alone or in combination with other treatments.

Therapy may also be given to patients who have had previous treatments which have been partially successful but are intolerant to the particular treatment. Therapy may also be given as an adjuvant treatment, *i.e.*, to prevent reoccurrence of cancer in patients
20 with no currently detectable disease or after surgical removal of tumor.

Cancers treated by the invention include primary tumors and secondary or metastatic tumors that have metastasized through the lymph system (including those metastasized from lung, breast, or prostate).

Cancers that may be treated include tumors that are not vascularized, or not yet
25 substantially vascularized, as well as vascularized tumors. The cancers may be comprised of non-solid tumors (such as leukemias and lymphomas) or may be solid tumors.

Types of cancers to be treated with the antibodies of the invention include ovarian cancer, human erythroleukaemia, head and neck cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, lung cancer and colon cancer. Further, given the role of the
30 VEGF-C/VEGFR-3 pathway in promoting lymphangiogenesis and given that, for most types of cancer, the first site of metastasis are lymph nodes, blocking the VEGF-C/VEGFR-3 pathway would be expected to inhibit lymph node metastases, e.g. from

-17-

breast, pancreatic, gastric or colorectal cancer (Roberts *et al.*, Cancer Res., 66(5), 2650-2657 (2006)).

The antibody may be administered alone (monotherapy), or in combination with one or more therapeutically effective agents or treatments (combination therapy). The other therapeutically effective agent may be conjugated to the antibody, incorporated into the same composition as the antibody, or may be administered as a separate composition. The other therapeutically effective agent or treatment may be administered prior to, during and/or after the administration of the antibody. The other therapeutically effective agent may be administered to augment the therapeutic effect of the antibody, or to diminish the negative side effects of the antibody.

The methods of treatment described herein can be used to treat any suitable mammal, including primates, such as monkeys and humans, horses, cows, cats, dogs, rabbits, and rodents such as rats and mice. In one embodiment, the mammal to be treated is human.

It will be seen by reference to the following examples that Antibody 1 binds an epitope on human VEGFR-3 comprising P219 as the dominant constituent of the epitope, V175 as a subordinate constituent of the epitope and L221 as a minor constituent of the epitope. Further it can be seen that Antibody 2 (a reference rat monoclonal antibody raised against murine VEGFR-3) binds an epitope on murine VEGFR-3 which comprises the residues L219 and V221. In addition, the examples also demonstrate that Antibody 1 has high affinity for human VEGFR-3 (56 pM), is able to block the binding of the ligand VEGF-C to VEGFR-3, is able to block the VEGF-C stimulated mitogenic response and is effective in *in vivo* xenograft models of ovarian cancer and HEL. Finally, it can also be seen that Antibody 2 is effective in xenograft models of head and neck cancer, breast cancer, lung cancer, RCC, pancreatic cancer and colon cancer.

EXAMPLE 1

The antibodies of the present invention may be made and purified using various suitable methods that are well known in the art. For example an appropriate host cell, such as HEK 293 EBNA or CHO, is either transiently or stably transfected with an expression system for secreting antibodies using an optimal predetermined light chain to heavy chain vector ratio or a single vector system encoding both a light chain (e.g. SEQ

-18-

ID NO: 12 for Antibody 1) and a heavy chain (e.g. SEQ ID NO: 14 for Antibody 1). Clarified medium into which the antibody has been secreted is purified using any of many commonly-used techniques. For example, the medium may be conveniently applied to a Protein A or G Sepharose FF column that has been equilibrated with a compatible buffer, such as phosphate buffered saline (pH 7.4). The column is washed to remove nonspecific binding components. The bound antibody is eluted, for example, by pH gradient (such as 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.8 to 0.1 M sodium citrate buffer pH 2.5). Antibody fractions are detected, such as by SDS-PAGE, and then are pooled. Further purification is optional, depending on the intended use. The antibody may be concentrated and/or sterile filtered using common techniques. Soluble aggregate and multimers may be effectively removed by common techniques, including size exclusion, hydrophobic interaction, ion exchange, or hydroxyapatite chromatography. The purity of the antibody after these chromatography steps is greater than 99%. The product may be immediately frozen at -70°C or may be lyophilized. The CDR and variable region amino acid sequences (determined using the Kabat method) for Antibody 1 are provided below.

Table 1. Light Chain CDR Amino Acid Sequences

mAb	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Antibody 1	RASQSISSSFLA (SEQ ID NO: 1)	AASTRAT (SEQ ID NO: 2)	QQYGRSLS (SEQ ID NO: 3)

Table 2. Heavy Chain CDR Amino Acid Sequences

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3
Antibody 1	GNSATWN (SEQ ID NO: 6)	RTYYRSKWNHDYAESVKS (SEQ ID NO: 7)	GDSSSWYAFDY (SEQ ID NO: 8)

Table 3. LCVR, HCVR, Light chain & Heavy chain Amino Acid Sequences

mAb	LCVR	HCVR	Light chain (signal sequence at residues 1-19)	Heavy chain (signal sequence at residues 1-19)
Antibody 1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 14

EXAMPLE 2

In the following example, experiments are described which lead to the elucidation of the epitope on the VEGFR-3 receptor to which Antibody 1 and Antibody 2 bind.

-19-

Production of VEGF-C_{ΔNΔC} and mouse and human sR3-AP. Recombinant mature human VEGF-C_{ΔNΔC} is generated as described in Pytowski, *et al.* (2005) J. Natl. Cancer Inst. 97(1):14-21. The full-length (i.e. Ig domains 1-7) soluble extracellular regions of human and mouse VEGFR-3 (sR3) are fused to cDNA encoding human alkaline phosphatase (AP) to generate the fusion protein sR3-AP (Persaud *et al.* (2004) J. Cell Science 117:2745-56; Pytowski, *et al.* (2005) J. Natl. Cancer Inst. 97(1):14-21).

Production of mouse-human chimeric sR3-AP and site-directed mutants of sR3-AP. Chimeric mouse-human and human-mouse constructs of the 3 N-terminal immunoglobulin-like (Ig) domains of sR3-AP are prepared using overlapping PCR technique (Ho, *et al.* (1989), Gene 77:51-59) and are cloned into the AP expression vector (Persaud, *et al.*, *supra*; Pytowski, *et al.*, *supra*). Site-directed mutagenesis of sR3-AP constructs is performed using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit per manufacturer's instructions (Stratagene). The presence of desired substitutions is verified by sequencing of both strands of the cDNA across the mutated region using the ABI Prism 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems) and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Expression of soluble VEGFR-3 proteins: The cDNA encoding extracellular regions of wild-type and mutated sR3-AP is transfected into FreeStyle™ 293 cells (Invitrogen, #R79007) cultured in suspension in a chemically-defined, protein-free FreeStyle™ 293 Expression Medium (Invitrogen, #12338026). In some cases, selected sR3-AP is purified using anti-AP antibody-affinity chromatography as previously described (Zhu, *et al.*, (1998) Cancer Res. 58:3209-14) or by affinity chromatography with immobilized mAbs Antibody 1 and Antibody 2 described herein.

Normalization of sR3 proteins in conditioned medium (CM): CM is assayed for AP activity using the Great EscApe™ SEAP Chemiluminescence kit 2.0 (Clontech, Mountain View, CA) using the Tropix TR7171 luminometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The CM is diluted in proportion to their AP activity in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (PBS-BSA) and retested to verify the normalization by AP activity measurements and by Western blotting.

sR3-AP binding assays: One hundred (100) μ l of normalized CM is transferred to 96-well microliter plates coated with either VEGF-C_{ΔNΔC}, or the test antibody

-20-

(200ng/well). After 2 hr incubation, the plates are washed 5 times and bound sR3-AP is detected by chemiluminescence.

The binding specificity of Antibody 1 and a reference rat monoclonal antibody
5 against mouse VEGFR-3 (designated 'Antibody 2') are tested by ELISA using the
immobilized extracellular portions of mouse and human VEGFR-3 (Ig domains 1-7).
Antibody 1 and Antibody 2 bind strongly and in a dose-dependent manner to human and
mouse VEGFR-3 respectively. The human antibody Antibody 1 shows slight but
reproducible cross-reactivity with mouse VEGFR-3 at concentrations exceeding 10 nM.
10 In contrast, Antibody 2 fails to demonstrate any detectable binding to human VEGFR-3.

*Epitopes of Antibody 1 and Antibody 2 are entirely contained within the second
immunoglobulin-like (Ig) domain of VEGFR-3:* The ligand-binding sites of all three
members of VEGF receptor family are contained within the three N-terminal Ig domains
of the extracellular domain. The species-specificity of Antibody 1 and Antibody 2 is
15 utilized to ascertain which of the first three Ig domains contains the epitopes of these
antibodies. DNA sequences encoding mouse and human Ig domains 1-3 are swapped in
various combinations to form the following VEGFR-3 extracellular domain constructs: i)
wild-type human; ii) wild-type mouse; iii) chimera 1 (human Ig1-human Ig2-mouse Ig3);
chimera 2 (human Ig1-mouse Ig2-mouse Ig3); (iv) chimera 3 (mouse Ig1-human Ig2-
20 mouse Ig3) and (v) chimera 4 (human Ig1-mouse Ig2-human Ig3). The constructs are
expressed as fusion proteins with alkaline phosphatase (AP) Persaud, *et al.*, *supra*. The
encoded proteins are isolated from conditioned media (CM) of transiently transfected
cells and normalized to equal protein concentration and AP activity. Mouse and human
sR3-AP bind human VEGF-C_{ΔNAC} with similar affinity. Thus, the ability of the various
25 sR3-AP chimeras to bind human VEGF-C_{ΔNAC} is tested as a means to determine that
correct protein folding is preserved in the chimeric receptors. The ability of Antibody 1
and Antibody 2 to bind to chimeric proteins 1 to 4 show that the epitopes of Antibody 1
and Antibody 2 are completely contained within the second Ig domain (Ig2) of human
and mouse VEGFR-3 respectively. For example, Antibody 1 will not bind to chimera 2
30 or chimera 4, which contain the mouse VEGFR3 sequence at Ig domain 2.

*Identification of amino acids of VEGFR-3 that constitute the epitopes of Antibody
1 and Antibody 2:* The twelve (12) positions within the amino acid sequence of the

-21-

second Ig domain of VEGFR-3 that differ between the human and mouse proteins are identified. These positions along with the residues in the human and mouse proteins are shown in Table 4.

5 **Table 4**

Position	153	167	175	177	184	192	194	199	214	219	221
Human	A	V	V	W	V	L	S	H	D	P	L
Mouse	S	I	A	H	L	R	P	R	N	L	V

Site-directed mutagenesis is used to individually change each of the species-specific amino acids in the human and mouse sequence to the corresponding orthologue of the opposite species; each mutated protein is then expressed in the context of sR3-AP proteins encoding the first, second and third Ig domains. Epitope mapping is accomplished by two complementary approaches. In the first approach, the loss of binding of the human-specific Antibody 1 and the mouse-specific Antibody 2 to their respective human and mouse sR3-AP due to individual amino acid substitutions to the mouse or human orthologues is measured. In the second approach, the gain of binding of Antibody 1 and Antibody 2 to the sR3-AP of the opposite species mediated by individual amino acid substitutions to the mouse or human orthologues is measured. A residue is considered as a strong candidate to constitute a part of an epitope of an antibody if the mutations described above lead to loss of binding with the first approach and a gain of binding with the second approach. For all mutant proteins, the binding to VEGF-C_{ΔNAC} is measured in parallel to check against gross changes in protein structure.

The binding experiments are carried out in triplicate and the results are calculated as the average and standard deviation of the three separate experiments. Of the 12 substitutions examined in the Ig2 domain of human sR3-AP, only one (V184L) leads to complete loss of binding to both VEGF-C_{ΔNAC} and Antibody 1. This change is thus considered as disturbing the overall structure of the human sR3-AP. The substitution V175A leads to approximately 50% loss of binding to both VEGF-C and to Antibody 1. The substitution P219L results in approximately 75% loss in binding to VEGF-C and nearly complete (~95%) loss of binding to Antibody 1. Change of L221 to V does not affect binding of human sR3-AP to VEGF-C but reduces binding to Antibody 1 by about

-22-

55%. The remaining substitutions do not lead to a substantial loss of binding to either VEGF-C or Antibody 1.

When individual mouse to human mutations in the mouse sR3-AP are examined for increased binding to the human specific Antibody 1, a significant increase above
5 binding to wild-type mouse sR3-AP is observed for the substitutions A175V (~12-fold) and L219P (~60-fold). None of the other substitutions lead to a significant increase of binding above background.

The criteria are thus set for considering an amino acid to comprise an epitope for Antibody 1 wherein human to mouse orthologue substitution in human sR3-AP would
10 significantly reduce binding to Antibody 1 while reducing (but NOT abolishing) or leaving unaffected the binding to VEGF-C_{ΔNAC}. In addition, for an amino acid to comprise an epitope for Antibody 1, mouse to human orthologue substitution in mouse sR3-AP would lead to significant binding to Antibody 1. For Antibody 1, these criteria are satisfied by V175 and P219 of human sR3-AP. V184 is excluded because a
15 substitution in human sR3-AP to the mouse orthologue abolishes both binding to VEGF-C_{ΔNAC} and to Antibody 1 while the corresponding substitution in mouse sR3-AP to the human orthologue at this position does not lead to binding to Antibody 1. Changing leucine 221 in human sR3-AP to the corresponding murine valine reduces binding to Antibody 1 by 55%. However, the corresponding substitution in mouse sR3-AP to the
20 human orthologue at this position does not lead to binding to Antibody 1. Therefore L221 may make a minor contribution to the epitope of Antibody 1 but does not meet all the criteria established above.

To study the role of the residue at position 221 further, the P219L and L221V mutations in human sR3-AP are combined into a single construct. The binding of the
25 double mutant to Antibody 1 is essentially abolished as compared to the single P219L mutant that retains 5% of binding to human sR3-AP.

Taken together, these results identify P219 as the dominant and V175 as a subordinate constituent of the epitope of Antibody 1 on human VEGFR-3 and raise the possibility that L221 is also a minor component of the epitope.

30 An examination is then made as to which residues of Ig domain 2 of the mouse VEGFR-3 constitute the epitope of Antibody 2 using a similar method. Again, the binding experiments are carried out in triplicate and the results are calculated as the

-23-

average and standard deviation of the three separate experiments. Of the twelve individual substitutions that change the mouse amino acid into the corresponding human amino acid, four substitutions (H177W, P194S, R199H and N214D) significantly reduce binding of mouse sR3-AP to both VEGF-C and Antibody 2. Interestingly, mutations at
5 positions 219 and 221 (L219P and V221L) reduce binding to Antibody 2 but not to VEGF-C. The corresponding human to mouse mutations in human VEGFR-3 at positions 219 and 221 (P219L and L221V) permit the binding of Antibody 2 to the human sR3-AP at levels, respectively approximately 55-fold and 10-fold, greater than the binding of Antibody 2 to the wild type human sequence. It is also demonstrated that the
10 binding of the mouse mutant proteins containing the human orthologue amino acid at positions 219 and 221 to VEGF-C_{ΔNΔC} increases slightly or is unaffected while the binding of these mutant proteins to Antibody 2 is either abolished (219) or reduced by about 85% (221).

The criteria set for considering an amino acid to comprise an epitope for Antibody
15 2 is that human orthologue substitution in mouse sR3-AP would significantly reduce binding to Antibody 2 while reducing (but NOT abolishing) or leaving unaffected the binding to VEGF-C_{ΔNΔC}. In addition, for an amino acid to comprise an epitope for Antibody 2, human to mouse orthologue substitution in human sR3-AP would lead to significant binding to Antibody 2. For Antibody 2, these criteria are satisfied by P219
20 and L221 of the mouse sR3-AP.

Another method to express the data is to calculate the percentage of maximal binding of Antibody 2 to wild type mouse sR3-AP that is reconstituted by each of the individual human to mouse orthologue mutations within the human sR3-AP sequence. This demonstrates that individually substituting P219L and L221V within the sequence of
25 human sR3-AP results in the reconstitution of about 5% and 1% respectively of the maximal binding to Antibody 2 seen with wild type mouse sR3-AP. It is therefore concluded that L219 and V221 are constituents of the epitope of Antibody 2.

It can be seen that Antibody 1 and Antibody 2 bind highly similar epitopes in human VEGFR-3 and mouse VEGFR-3 respectively, with the residue at position 219
30 being the key residue in each case. The data in the following examples demonstrate that both Antibody 1 and Antibody 2 are neutralising antibodies which are able to block the activity of their respective antigens as well as inhibit tumour growth in *in vivo* xenograft

-24-

models. Such data provides further evidence to demonstrate that the novel epitope in the Ig2 domain of VEGFR-3 identified herein provides the key advantageous feature of being a neutralising epitope. Antibodies binding to said epitope are thus able to block ligand binding, VEGFR-3 signalling and inhibit tumour growth *in vivo*.

5

EXAMPLE 3: Affinity (K_d) Measurements for anti-VEGFR-3 antibodies

The binding kinetics of the Antibody 1 are measured by surface plasmon resonance on the BIACORE[®] 2000 biosensor (BIACORE[®], Piscataway, NY) at 20°C. Soluble extracellular domain of human VEGFR-3 (sR3-AP) is immobilized on a sensor chip and Antibody 1 is injected over the surface of the sensor at concentrations between 0.8 and 6.25 nM. Sensograms are evaluated using the BIA Evaluation 3.2 program to determine the on rates (k_a) and the off rates (k_d). The dissociation constant (K_d) is calculated from the k_a and k_d rates using the equation: $K_d = k_d/k_a$. BIAcore kinetic analysis yields a K_d of 56 pM for the binding of Antibody 1 to immobilized sR3-AP. Thus, Antibody 1 has an extremely high affinity for human VEGFR-3 wherein said affinity is nearly 2 orders of magnitude greater than that of sR3-AP for VEGF- $C_{\Delta NAC}$.

EXAMPLE 4: Blockade of VEGF-C binding to VEGFR-3 by anti-VEGFR-3 antibodies

To measure the ability of VEGFR-3 antibodies to block VEGF-C binding to human VEGFR-3, a competitive VEGF-C blocking assay is utilized. Antibodies or soluble phage particles at a concentration of 0.001 µg/ml to 5 µg/ml are mixed with 50 ng of sR3-AP, incubated at room temperature for 1 hour and transferred to 96-well microtiter plates coated with VEGF- $C_{\Delta NAC}$ (200 ng/well). After an additional 2 hours, the plates are washed five times and p-nitrophenyl phosphate (Sigma) is added to quantify the bound sR3-AP molecules at OD_{405nm}. The IC₅₀, i.e. the concentration of Fab or IgG required for 50% inhibition of sR3-AP binding to VEGF- $C_{\Delta NAC}$, is calculated. The Fab and IgG forms of Antibody 1 strongly block the binding of sR3-AP to immobilized VEGF- $C_{\Delta NAC}$ with an IC₅₀ of 2 and 1.3 nM, respectively. By contrast, a control antibody which targets the human IGF receptor and is obtained from the same phage library is inactive.

-25-

EXAMPLE 5: Inhibition of VEGF- C_{ΔNΔC} -stimulated mitogenic response by Antibody 1

In order to test the ability of Antibody 1 to inhibit signal transduction mediated by VEGFR-3, a NIH-3T3 cell line is prepared that expresses a chimeric form of VEGFR-3 which fuses the extracellular domain of human VEGFR-3 with the transmembrane and cytoplasmic domains of human cFMS. No endogenous expression of VEGFR-3 by the parental cells is detected, and localization of the chimeric receptor on the plasma membrane is shown by FACS analysis. VEGFR-3-FMS cells (5×10^3 cells/well) are plated onto 96-well tissue culture plates (Wallac, Gaithersburg, MD) in 200 μ l of serum free medium and incubated at 37°C for 72 hours. Antibody up to 20 nM is added and pre-incubated at 37°C for 1 hour, after which VEGF- C_{ΔNΔC} is added to a final concentration of 20 ng/ml. After 18 hours of incubation, 0.25 mCi of tritiated thymidine ($[^3\text{H}]\text{-TdR}$) (Amersham) is added to each well and incubated for an additional 4 hours. The cells are placed on ice, washed once with serum containing medium, incubated for 10 minutes at 4°C with 10% TCA, and solubilized in 25 μ l of 2% SDS. Incorporated radioactivity is determined on a scintillation counter (Wallac, Model 1450 Microbeta Scintillation Counter). The incorporation of $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ by the NIH-3T3 cells that express VEGFR-3-cFMS is stimulated by at least threefold by the addition of VEGF- C_{ΔNΔC}. The mitogenic response is specifically blocked in a dose-dependent manner by Antibody 1, with an IC₅₀ value of 5 nM.

EXAMPLE 6: Anti-VEGFR-3 monoclonal antibodies in a human ovarian carcinoma cell line subcutaneous xenograft model

In this experiment, anti-VEGFR3 monoclonal antibodies Antibody 1 and Antibody 2 are used alone or in combination on xenografts of human ovarian carcinoma cell line OVCAR-8 (NCI-60, Developmental Therapeutics Program, NCI/NIH) in immunodeficient SCID mice. OVCAR-8 is one of very few human carcinoma cell lines that express human VEGFR-3. The expectation in this experiment is that Antibody 2 will block angiogenesis and lymphangiogenesis in the mouse stroma of the growing tumor while having no effect on the tumor. In contrast, Antibody 1 is expected to only act on the human carcinoma cells.

-26-

OVCAR-8 cells are injected s.c. into the left flank of 75 female athymic mice at 1×10^7 cells/mouse. When tumors reach $\sim 180 \text{ mm}^3$, 13 days after cell implantation, the mice are randomized and divided into five treatment groups ($n = 12$): USP saline control, 0.5ml/dose; Rat IgG at 40mg/kg; Antibody 1 at 40mg/kg; Antibody 2 at 40mg/kg and
 5 Antibody 1 at 40mg/kg + Antibody 2 at 40mg/kg. Anti-VEGFR-3 mAbs and controls are given i.p. on a Mon-Wed-Fri schedule. Tumor measurements are recorded twice weekly. The T/C% is calculated for each treatment group as the ratio of the relative tumor volume of each treatment group versus the relative tumor volume of the saline control group. RM ANOVA through Day 41 is used to compare tumor growth among the treatment groups.

10 Antibody 2 significantly inhibits the growth of OVCAR-8 tumors with a T/C% of 71% ($P = 0.0299$). Antibody 1 has a trend toward efficacy in this model (T/C% was 74%) but the degree of tumor inhibition does not reach significance ($P > 0.05$). This may be due to the wide range of tumor volumes at Day 41 in this group ($335\text{-}1504 \text{ mm}^3$) that may have prevented this group from reaching statistical significance.

15 The combination of Antibody 1 and Antibody 2 together enhances the tumor inhibitory effect of Antibody 2 (T/C% was 47% and the combination effect reaches significance compared to either antibody alone ($P \leq 0.0358$)).

Antibody 2 significantly inhibits the growth of OVCAR-8 tumors while Antibody 1 appears to be efficacious in this model without reaching statistical significance.
 20 However, since the combination of the two monoclonal antibodies significantly inhibits OVCAR-8 tumor growth compared to Antibody 2 monotherapy, it is concluded that Antibody 1 demonstrated therapeutic efficacy in this experiment. Accordingly, the antibodies of the present invention demonstrate anti-tumour efficacy in an *in vivo* model of ovarian cancer.

25

EXAMPLE 7: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 1 in the human erythroleukemia (HEL) cell subcutaneous xenograft model

In the following example, a significant anti-tumor effect is measured for Antibody 1 in the human erythroleukemic (HEL) cell subcutaneous xenograft model.

30 Nu/nu mice (female, 7-8 weeks) housed 5-6 per cage are injected subcutaneously with 5×10^6 HEL cells/mouse. When tumors reach approximately 400 mm^3 , mice are randomized by tumor volume into one of four treatment groups ($n=11/\text{group}$):

-27-

- 1) USP saline, 10 ml/kg,
- 2) Antibody 1, 60 mg/kg (loading dose of 150 mg/kg on Day 1)
- 3) Antibody 1, 20 mg/kg (loading dose of 50 mg/kg on Day 1)
- 4) Antibody 1, 6 mg/kg (loading dose of 15 mg/kg on Day 1)

5 Antibody 1 is prepared in USP saline. Treatments are administered i.p., twice a week, at 10 ml dosing solution/kg of body weight. The first dose, the loading dose, is administered on Day 1, followed by the maintenance dose administered twice a week for the duration of the study. Tumor volumes are measured twice a week. Body weights are recorded at least twice a week for the duration of the study. The T/C% is calculated for

10 each treatment group on Day 18 as the ratio of the relative tumor volume of each treatment group versus the relative tumor volume of the saline control group (Table 5). Tumor growth and body weight change in the treatment groups are compared by Repeated Measures ANOVA.

Treatment with Antibody 1 results in a dose dependent inhibition of HEL tumor

15 growth, with 60 mg/kg Antibody 1 significantly inhibiting tumor growth ($p=0.0031$). There is no effect on body weight with Antibody 1 treatment in this study (Table 5). Accordingly, the antibodies of the present invention demonstrate anti-tumor efficacy in an *in vivo* model of HEL, while resulting in minimal adverse side effects in that model.

20 **Table 5**

	T/C% on Day 18	RM ANOVA for Tumor Volume	Final Mean % Body Weight Change	RM ANOVA for Body Weight
Saline Control			6.6	
Antibody 1 60 mg/kg	52.5	0.0031	4.6	0.21
Antibody 1 20 mg/kg	69.6	0.13	3.2	0.20
Antibody 1 6 mg/kg	81.9	0.39	4.6	0.41

-28-

EXAMPLE 8: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 2 in combination with cisplatin in the CAL27 squamous cell carcinoma xenograft model

In order to test for activity of anti-VEGFR-3 antibodies in head and neck cancer, the CAL27 xenograft model is used. CAL27 cell suspension, at 1×10^7 cells/mouse, is injected s.c. into the left flank of 60 female athymic mice. When tumors reach $\sim 180 \text{ mm}^3$, eight days after cell implantation, the mice are randomized and divided into four treatment groups (n = 12): 1.) USP saline control, 0.5 ml i.p., 3 days per week 2.) Antibody 2 at 40 mg/kg, 3 days per week 3.) cisplatin at 7 mg/kg, q7d 4.) Antibody 2 at 40 mg/kg, 3 days per week + cisplatin at 7 mg/kg, q7d.

Tumor measurements are recorded twice weekly; RM ANOVA through Day 61 is used to compare tumor growth among the treatment groups. Chi Squared tests are used to test for statistical significance in the number of tumor regressions among the treatment groups.

Monotherapy using Antibody 2 or cisplatin significantly inhibits the growth of CAL27 tumors compared to the USP saline control ($P \leq 0.0077$). The T/C% values are 55% and 39% for Antibody 2 and for cisplatin, respectively. Combination therapy with both Antibody 2 and cisplatin results in significant inhibition of tumor growth when compared to monotherapy ($P \leq 0.0322$). The effect of combination therapy is greater-than-additive as determined by the Fractional Product Method. Accordingly, an anti-VEGFR-3 antibody binding to an epitope in the Ig2 domain of VEGFR-3 demonstrates anti-tumor efficacy in an *in vivo* model of head and neck cancer either as a monotherapy or in combination with cisplatin.

EXAMPLE 9: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 2 in combination with 5-Fluorouracil / Leucovorin in an MDA-MB-231 breast cancer xenograft model

In order to test for activity of anti-VEGFR-3 antibodies in breast cancer, the MDA-MB-231 xenograft model is used. NIH nu/nu athymic mice (female 8 weeks) are injected subcutaneously in the mammary fat pad with 6×10^6 MDA-MB-231 cells in 0.4ml (1:1 w/matrigel). When tumors reach approximately 300 mm^3 , mice are randomized by tumor size into the following treatment groups (n=12): 1) USP saline 10 $\mu\text{l/g}$, 3 times per week 2) 40 mg/kg Antibody 2, 3 times per week 3) 125 mg/kg 5FU (5-Fluorouracil) + 62 mg/kg LV (Leucovorin), once per week 4) Antibody 2 at 40 mg/kg, 3

-29-

times per week + 5FU/LV at 125 mg/kg and 62 mg/kg, respectively, once per week. All agents are prepared the day of treatment and administered i.p. Cytotoxic treatment is started one day prior to the start of antibody treatment.

A comparison of the tumor volumes from the saline control group versus the tumor volumes of the treated mice shows significant tumor growth inhibition with Antibody 2 or Antibody 2 + 5FU/LV administration (see Table 6). While the effects of the combination of Antibody 2 + 5FU/LV are not greater than that of the monotherapies, there is a trend for increased antitumor effects for the combination. Accordingly, an anti-VEGFR-3 antibody binding to an epitope in the Ig2 domain of VEGFR-3 demonstrates anti-tumor efficacy in an *in vivo* model of breast cancer (compared to saline control) either as a monotherapy or in combination with 5FU/LV.

Table 6

	Tumor Volumes	
	¹ p- value	T/C%
Antibody 2 v. USP saline	p=0.04	49
5FU/LV v. USP saline	p=0.17	52
Antibody 2 + 5FU/LV v. USP saline	p<0.01	28
Antibody 2 v. Antibody 2 + 5FU/LV	p=0.09	57
5FU/LV v. Antibody 2 + 5FU/LV	p=0.09	54

¹ RM ANOVA through Day 34

15

EXAMPLE 10: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 2 alone and in combination with Docetaxel in a NCI-H292 Lung cancer xenograft model

In order to test for activity of anti-VEGFR-3 antibodies in lung cancer, the NCI-H292 xenograft model is used. Nu/nu mice (female, 7-8 weeks of age) are injected subcutaneously with 2×10^6 NCI-H292 cells/mouse. When tumors reach approximately 300 mm³, mice are randomized by tumor size into the following treatment groups (n=15): 1) USP saline at 10 µl/g, 3 times per week, i.p., starting on day 2. 2) Antibody 2 at 40 mg/kg, 3 times per week, i.p., starting day 2. 3) Docetaxel at 12 mg/kg, q7d, starting day 1. 4) Docetaxel at 12 mg/kg, q7d, starting day 1 plus Antibody 2 at 40 mg/kg, 3 times per week, starting day 2.

Tumor volumes are measured approximately twice a week and body weights are recorded at least twice a week for the duration of the study. At sacrifice, mice are

-30-

ethanized by CO₂ asphyxiation. The T/C% is calculated for each treatment group as the ratio of the relative tumor volume in the experimental groups versus the control group. Tumor growth and body weights are compared to the control group by repeated measures ANOVA through Day 26.

- 5 Treatment with Antibody 2 and Docetaxel significantly inhibits NCI-H292 tumor growth with T/C% values of 74% and 49%, respectively. Combination therapy of Antibody 2 and Docetaxel significantly increases antitumor efficacy compared to either monotherapy with a T/C% of 24%. Accordingly, an anti-VEGFR-3 antibody binding to an epitope in the Ig2 domain of VEGFR-3 demonstrates anti-tumor efficacy in a further *in*
10 *vivo* model of lung cancer either as a monotherapy ($p < 0.0001$) or in combination with Docetaxel ($p < 0.0001$).

EXAMPLE 11: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 2 in a Subcutaneous SK-RC-29 Human Renal Cell Carcinoma (RCC) Xenograft Model

- 15 In order to test for activity of anti-VEGFR-3 antibodies in RCC, the SK-RC-29 Human Renal Cell Carcinoma xenograft model is used. Female athymic nu/nu mice ($n = 12$ per group) are implanted s.c. with 2×10^6 SK-RC-29 RCC cells per mouse. The cells are injected as a mixture in 1:1 Matrigel® basement membrane ($V_t = 0.4$ ml). When tumors reach 200 - 250 mm³, mice are randomized into groups and i.p. dosing is initiated
20 with control group receiving USP Saline (500 μ l/injection) and Antibody 2 group receiving 60 mg/kg for the first dose and 40 mg/kg on all subsequent doses. Tumor volume measurements are recorded twice weekly, for 43 days. Representative tumor samples ($n = 4$ per treatment group) were taken at day 48 (end of the study) for histological analysis. To determine the significance of anti-tumor effects between
25 treatment groups, statistical analysis was performed using Repeated Measures (RM) ANOVA. Weight loss due to antibody toxicity did not occur in any of the treatment groups as measured day 47. In fact, the weight of the mice treated with antibody increased by approximately 5.5 % over the course of the study.

- To assess anti-tumor efficacy and calculate T/C % values, all treatment groups are
30 compared to control mice up to day 32. Antibody 2 yields a T/C % of 62% ($p = 0.012$); this demonstrates inhibition of the growth of renal cell carcinoma in a subcutaneous xenograft model with minimal adverse side effects.

EXAMPLE 12: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 2 in BxPC-3 Pancreatic Carcinoma Xenografts

In order to test for activity of anti-VEGFR-3 antibodies in pancreatic carcinoma, the BxPC-3 Pancreatic Carcinoma Xenograft model is used. Female athymic nu/nu mice ($n = 36$) are injected s.c. with 2×10^6 BxPC-3 human pancreatic cells/mouse mixed in 1:1 Matrigel. When tumors reach $\sim 350\text{mm}^3$, the animals are separated into three treatment groups ($n = 10$): 1) USP saline. 2) mAb Antibody 2 at 10mg/kg. 3) mAb Antibody 2 at 40mg/kg. All treatments are administered i.p. three times per week at 0.1ml/10g body weight. Tumor volume measurements are recorded twice weekly, for six weeks.

Antibody 2 treatment inhibits growth of BxPC-3 tumors in a dose-dependent manner. At the end of the study on Day 40, the T/C values are 75% ($p=0.042$) and 56% ($p=0.002$) for the 10mg/kg and 40mg/kg dose groups, respectively.

EXAMPLE 13: Anti-VEGFR-3 mAb Antibody 2 in Combination with Oxaliplatin on HT-29 Colon Xenografts

In order to test for activity of anti-VEGFR-3 antibodies in colon cancer, the HT-29 Colon xenograft model is used. HT-29 cell suspension, at 5×10^6 /mouse, is injected s.c. into the left flank of 60 female athymic mice. When tumors reach $\sim 180\text{mm}^3$, eight days after cell implantation, the mice are randomized and divided into four treatment groups ($n = 12$): 1) USP saline control, 0.5ml i.p., three times per week. 2) Antibody 2 at 40mg/kg, three times per week. 3) oxaliplatin at 12mg/kg, q7d. 4) Antibody 2 at 40mg/kg, three times per week + oxaliplatin at 12mg/kg, q7d.

Tumor measurements are recorded twice weekly; RM ANOVA is used to compare tumor growth among the treatment groups. Antibody 2 alone does not significantly inhibit the growth of HT-29 tumors; the antibody has a trend for efficacy with a T/C% of 80%. Combination therapy with both Antibody 2 and oxaliplatin significantly inhibits the growth of HT-29 tumors compared to control or to either monotherapy ($P \leq 0.0280$) with a T/C% of 47%. Accordingly, an anti-VEGFR-3 antibody binding to an epitope in the Ig2 domain of VEGFR-3 demonstrates anti-tumor efficacy in an *in vivo* model of colon cancer when used in combination with oxaliplatin.

-32-

WE CLAIM:

1. An antibody or antigen binding portion thereof that specifically binds to human VEGFR-3 comprising a LCDR1 of SEQ ID NO 2, a LCDR2 of SEQ ID NO 2, a
5 LCDR3 of SEQ ID NO 3, a HCDR1 of SEQ ID NO 6, a HCDR2 of SEQ ID NO 7 and a HCDR3 of SEQ ID NO 8.
2. The antibody or antigen binding portion thereof of claim 1, comprising a light chain variable region of SEQ ID NO: 5 and a heavy chain variable region of SEQ ID
10 NO: 10.
3. The antibody or antigen binding portion thereof of claim 1 or 2, wherein the antibody comprises a light chain of SEQ ID NO: 15 and a heavy chain of SEQ ID
15 NO: 16.
4. The antibody or antigen binding portion thereof of claim 3, wherein the antibody comprises two light chains of SEQ ID NO: 15 and two heavy chains of SEQ ID
NO: 16.
- 20 5. An antibody or antigen binding portion thereof of any of claims 1-4 wherein:
 - a) the binding of said antibody to human VEGFR-3 is reduced by at least 90% by singly mutating Pro-219 of human VEGFR-3 to Leu; and
 - b) the binding of said antibody to human VEGFR-3 is reduced by at least
25 50% by singly mutating Val-175 of human VEGFR-3 to Ala.
6. The antibody or antigen binding portion thereof of any of claims 1-4 wherein the binding of said antibody to human VEGFR-3 is reduced by at least 50% by singly mutating Leu-221 of human VEGFR-3 to Val.
30
7. The antibody or antigen binding portion thereof of any of claims 1-4 that also binds to a mutant mouse VEGFR-3 of SEQ ID NO. 20 and a mutant mouse

-33-

VEGFR-3 of SEQ ID NO. 21, wherein the binding to the mutant mouse VEGFR-3 of SEQ ID NO. 20 is increased by more than 50-fold when compared with the binding to wild type mouse VEGFR-3 (SEQ ID NO. 19) and the binding to the mutant mouse VEGFR-3 of SEQ ID NO. 21 is increased by more than 10-fold when compared with the
5 binding to wild type mouse VEGFR-3.

8. The antibody or antigen binding portion thereof of any one of claims 1 to 4 wherein the antibody has a K_d of 1×10^{-9} M to 5.6×10^{-11} M for human VEGFR-3 as measured by surface plasmon resonance on a BIACORE[®] 2000 biosensor at 20°C.
10

9. The antibody or antigen binding portion thereof of any one of claims 1 to 4, wherein the antibody inhibits the binding of human VEGF- $C_{\Delta N\Delta C}$ (SEQ ID NO: 22) to human VEGFR-3 with an IC_{50} of 2 nM to 1.3 nM.
15

10. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of claims 1 to 4, wherein the antibody inhibits the VEGF- $C_{\Delta N\Delta C}$ stimulated mitogenic response with an IC_{50} of 10 nM to 5 nM.

20 11. A pharmaceutical composition comprising the antibody or antigen binding portion thereof of any one of claims 1 to 10 together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

12. A pharmaceutical composition as claimed in claim 11 wherein said
25 composition optionally contains at least one other therapeutic ingredient.

13. The antibody or antigen binding portion thereof of any one of claims 1 to 10 for use as a medicament.
30

14. The antibody or antigen binding portion thereof of any one of claims 1 to 10 for use in the treatment of ovarian cancer, human erythroleukaemia, head and neck

-34-

cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, lung cancer, colon cancer and lymph node metastases.

15. The antibody or antigen binding portion thereof of any one of claims 1 to 7
5 in combination with a further anti-cancer agent selected from cisplatin, 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and docetaxel for simultaneous, separate or sequential use in therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/050131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. PERSAUD: "Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C", JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 117, no. 13, 1 June 2004 (2004-06-01) , pages 2745-2756, XP55010516, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.01138 the whole document ----- -/--	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 2011

Date of mailing of the international search report

08/11/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aguilera, Miguel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/050131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	B. PYTOWSKI ET AL: "Complete and Specific Inhibition of Adult Lymphatic Regeneration by a Novel VEGFR-3 Neutralizing Antibody", JNCI JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, vol. 97, no. 1, 4 January 2005 (2005-01-04), pages 14-21, XP55010514, ISSN: 0027-8874, DOI: 10.1093/jnci/dji003 the whole document -----	1-15
A	WO 02/060950 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; LICENTIA LTD [FI]; ALITALO KARI [FI]; APR) 8 August 2002 (2002-08-08) examples 25-32 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/050131

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02060950	A2	08-08-2002	AT 359300 T 15-05-2007
		CA 2435503 A1 08-08-2002	
		CN 1494552 A 05-05-2004	
		DE 60219419 T2 16-08-2007	
		EP 1353952 A2 22-10-2003	
		JP 4669984 B2 13-04-2011	
		JP 2004532004 A 21-10-2004	
		JP 2010088433 A 22-04-2010	
		NO 20033285 A 19-09-2003	
		US 2006177901 A1 10-08-2006	

COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-VEGFR-3

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se dirige a anticuerpos que se unen
5 específicamente al Receptor-3 del Factor de Crecimiento
Endotelial Vascular (VEGFR-3), particularmente se
proporcionan en la presente secuencias de ácido nucleico y
aminoácido de anticuerpos anti-VEGFR, composiciones
farmacéuticas, y usos de los anticuerpos en métodos para
10 tratar una condición médica mediada por VEGFR-3.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los factores de crecimiento específicos de la
célula endotelial y receptores, se cree son principalmente
15 responsables de la estimulación del crecimiento de células
endoteliales, diferenciación, así como también de ciertas
funciones celulares. Una familia ampliamente estudiada de
factores de crecimiento comprende Factores de Crecimiento
Endotelial Vascular (VEGFs).

20 El VEGFR-3 es el único receptor de tirosina cinasa
(RTK) cuya expresión en tejidos adultos normales está
ampliamente restringida al endotelio linfático. El VEGF-C y
VEGF-D nacientes se enlazan específicamente a VEGFR-3. El
desdoblamiento proteolítico de las regiones N y C-terminales
25 de estas proteínas libera VEGF-C_{ΔNΔC} y VEGF-D_{ΔNΔC} maduro, los

cuales adquieren afinidad incrementada para VEGFR-3. Estos ligandos activan la señalización de VEGFR-3 e inician la linfangiogénesis (es decir, la formación de nuevos vasos linfáticos de vasos linfáticos pre-existentes).

5 El patrón de expresión de los ligandos para VEGFR-3 sugiere su inclusión no solamente en el desarrollo y mantenimiento del sistema vascular normal sino también en la linfangiogénesis y angiogénesis del tumor. Además, la expresión de VEGFR-3 ha sido detectada en capilares
10 sanguíneos dentro de los tumores. De este modo anticuerpos monoclonales (mAbs) que inhiben el enlace de VEGF-C y/o VEGF-D a VEGFR-3 tienen el potencial de inhibir la angiogénesis del tumor.

 Además, el bloqueo de la actividad de VEGFR-3 ha
15 sido mostrado por inhibir la linfangiogénesis de tumor incrementada por VEGF-C. En muchos tipos de cáncer, el primer sitio de metástasis son los nodos linfáticos y por lo tanto el bloqueo de VEGFR-3 tiene el potencial de inhibir la metástasis del tumor.

20 Persaud, *et al.*, J. Cell Science 117:2745-56 (2004), describe ciertas propiedades de un anticuerpo monoclonal anti-VEGFR-3 humano, pero no describe la secuencia de tales anticuerpos ni los epítopes que tales anticuerpos pueden enlazar. Permanece una necesidad de anticuerpos anti-
25 VEGFR-3 de alta afinidad que unen nuevos epítopes dentro de

VEGFR-3 y los cuales son capaces de bloquear el enlace del ligando y activación del receptor. Además, existe una necesidad de anticuerpos anti-VEGFR-3 los cuales sean capaces de demostrar eficacia anti-tumoral contra una variedad de tipos de tumor, sin efectos secundarios negativos significantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que se une a VEGFR-3 humano en donde:

- a) el enlace del anticuerpo a VEGFR-3 humano se reduce por al menos 90% mutando ligeramente Pro-219 de VEGFR-3 humano a Leu; y
- b) el enlace del anticuerpo a VEGFR-3 humano se reduce por al menos 50% mutando ligeramente Val-175 de VEGFR-3 humano a Ala.

Preferiblemente, el nivel de enlace entre el anticuerpo, o fragmento del mismo enlazante al antígeno, y el VEGFR-3 mutante o humano se ensaya expresando el dominio extracelular soluble del VEGFR-3 mutante o humano como una proteína de fusión con fosfatasa alcalina y después determinando la cantidad de cada proteína de fusión que es capaz de enlazarse al anticuerpo usando un ensayo de quimioluminiscencia de fosfatasa alcalina.

La invención además proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la presente invención junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la presente invención junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente contiene al menos otro ingrediente
10 terapéutico.

La invención también proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la invención para uso como un medicamento.

La invención adicionalmente proporciona un
15 anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la invención para uso en el tratamiento o prevención de cáncer de ovario, eritroleucemia humana, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon y metástasis
20 de nodo linfático.

La invención además proporciona un método para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer de ovario, eritroleucemia humana, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer
25 pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon y metástasis

de nodo linfático en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la invención.

5 La invención adicionalmente proporciona un uso de un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer de ovario, eritroleucemia humana, cáncer de cabeza y cuello,
10 cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon y metástasis de nodo linfático.

 La invención también proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la invención en
15 combinación con un agente anti-cancerígeno adicional seleccionado de cisplatino, 5-fluorouracilo, leucovorina, oxiplatino y docetaxel para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia.

 La invención adicionalmente proporciona un método
20 para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer de ovario, eritroleucemia humana, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon y metástasis de nodo linfático en un mamífero, que comprende administrar a
25 un paciente en necesidad del mismo una combinación

terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de la invención y un agente anti-cancerígeno adicional seleccionado de cisplatino, 5-fluorouracilo, leucovorina, oxiplatino y docetaxel.

5 Los anticuerpos de la presente invención se unen al segundo dominio similar a inmunoglobulina (Ig) de un VEGFR-3 de mamífero. El segundo dominio similar a Ig de VEGFR-3 humano corresponde a los residuos 138 a 226 del receptor de longitud completa. Véase, Pajusola, *et. al.*, Cancer Res.
10 52:5738-5743 (1992).

 El término "segundo dominio similar a Ig de un VEGFR-3 de mamífero/humano/ratón" (y variaciones de los mismos) está propuesto para abarcar formas que se originan naturalmente del dominio (*por ejemplo*, purificado de una
15 célula que expresa el dominio bajo condiciones normales) así como también versiones recombinantes, *por ejemplo*, codificadas por mutantes de punto sintético o que se originan naturalmente o versiones truncadas de las mismas.

 Los anticuerpos de la presente invención se unen a
20 un epítotope en el segundo dominio similar a Ig de VEGFR-3 humano en donde P219 es el constituyente dominante del epítotope, V175 es un constituyente subordinado del epítotope y L221 es un constituyente menor del epítotope. (La numeración de estos residuos es consistente con el VEGFR-3 humano de
25 longitud completa, como se reporta en Pajusola, *et. al.*,

supra, y base de datos EMBL, número de acceso X 68203). Este hallazgo se basa en parte, en la observación que incluye las mutaciones V175A o P219L o L221V (es decir, sustituyendo los residuos VEGFR-3 murino ortólogos) en VEGFR-3 humano abole o
5 reduce significativamente el enlace de anticuerpos de la presente invención al VEGFR-3 humano mutante.

Sin embargo, los anticuerpos de la presente invención que se unen a un epítotope en VEGFR-3 humano (en donde P219 es el constituyente dominante del epítotope, V175 es
10 un constituyente subordinado del epítotope y L221 es un constituyente menor del epítotope) son capaces de bloquear el enlace del ligando VEGF-C a VEGFR-3 y de este modo neutralizan la actividad del receptor. Por consiguiente, la presente invención proporciona un nuevo epítotope neutralizante
15 en VEGFR-3 humano que permite la producción de nuevos anticuerpos neutralizantes a VEGFR-3 humano, los cuales son capaces de bloquear el enlace de VEGF-C humano al receptor. La invención de este modo proporciona un epítotope de VEGFR-3 humano en donde P219 es el constituyente dominante del
20 epítotope, V175 es un constituyente subordinado del epítotope y L221 es un constituyente menor del epítotope.

La invención también proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que une un epítotope de VEGFR-3 humano que comprende los residuos de aminoácido
25 P219 y V175. Preferiblemente la invención también proporciona

un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que
une un epítoto de VEGFR-3 humano que comprende los
aminoácidos P219, V175 y L221. Tal epítoto está unido por
anticuerpos de la presente invención (por ejemplo Anticuerpo
5 1) y por lo tanto la invención también proporciona un
anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno que
reacciona con el mismo epítoto de VEGFR-3 humano como un
anticuerpo que tiene una cadena ligera que comprende la
secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 15 y una cadena
10 pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID
NO: 16. Un anticuerpo que reacciona con el mismo epítoto de
VEGFR-3 humano como ciertos anticuerpos de la presente
invención (por ejemplo Anticuerpo 1) podrían competir por
enlace a VEGFR-3 humano y por consiguiente la invención
15 también proporciona un anticuerpo, o porción del mismo
enlazante al antígeno que compite con un anticuerpo que tiene
una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de
la SEC ID NO: 15 y una cadena pesada que comprende la
secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16 para enlace a
20 VEGFR-3 humano.

Preferiblemente, un anticuerpo de la presente
invención también se une a un VEGFR-3 mutante de ratón que
tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 20 (la cual
incluye la mutación L219P) y un VEGFR-3 mutante de ratón que
25 tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 21 (la cual

incluye la mutación A175V) en donde el enlace al VEGFR-3 mutante de ratón que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 20 se incrementa por más de 50-veces cuando se compara con el enlace a VEGFR-3 de ratón tipo nativo (SEC ID NO: 19) y el enlace al VEGFR-3 mutante de ratón que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 21 se incrementa por más de 10-veces cuando se compara con el enlace a VEGFR-3 de ratón tipo nativo.

Preferiblemente el nivel de enlace entre el anticuerpo, o fragmento del mismo enlazante al antígeno, y el VEGFR-3 mutante de ratón o de ratón tipo nativo se ensaya expresando el dominio extracelular soluble del VEGFR-3 mutante de ratón o de ratón tipo nativo como una proteína de fusión con fosfatasa alcalina y después determinando la cantidad de cada proteína de fusión que es capaz de enlazarse al anticuerpo usando un ensayo de quimioluminiscencia de fosfatasa alcalina.

Preferiblemente, un anticuerpo de la presente invención, o porción del mismo enlazante al antígeno, tiene una alta afinidad para VEGFR-3 humano. Por ejemplo, un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que tiene un K_d de entre 1×10^{-9} M y 5.6×10^{-11} M para VEGFR-3 humano como se mide por resonancia de plasmón de superficie en un biosensor BIACORE® 2000 a 20°C. Más preferiblemente el anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, tiene

un K_d de entre 1×10^{-10} M y 5.6×10^{-11} M para VEGFR-3 humano como se mide por resonancia de plasmón de superficie en un biosensor BIACORE® 2000 a 20°C.

Preferiblemente, la presente invención proporciona
5 un anticuerpo anti-VEGFR-3, o porción del mismo enlazante al antígeno, que inhibe el enlace de VEGF- C_{ANAC} humano a VEGFR-3 humano con un IC_{50} de entre 2 nM y 1.3 nM.

Preferiblemente, la presente invención proporciona
un anticuerpo anti-VEGFR-3, o porción del mismo enlazante al
10 antígeno, que inhibe la respuesta mitogénica estimulada por VEGF- C_{ANAC} con un IC_{50} de entre 10 nM y 5 nM. Más preferiblemente el anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, inhibe la respuesta mitogénica estimulada por VEGF- C_{ANAC} con un IC_{50} de entre 8 nM y 5 nM, muy
15 preferiblemente entre 6 nM y 5 nM en un ensayo como se describe en el Ejemplo 5.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que une VEGFR-3 humano y el cual comprende una región variable de
20 cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y la HCVR comprende CDRs HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, LCDR2
25 comprende el polipéptido de la SEC ID NO: 2, LCDR3 comprende

el polipéptido de la SEC ID NO: 3, HCDR1 comprende el polipéptido de la SEC ID NO: 6, HCDR2 comprende el polipéptido de la SEC ID NO: 7 y HCDR3 comprende el polipéptido de la SEC ID NO: 8.

5 Más preferiblemente, la presente invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que une VEGFR-3 humano y que comprende un polipéptido LCVR de la SEC ID NO: 5 y un polipéptido HCVR de la SEC ID NO: 10.

10 Más preferiblemente, la presente invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que une VEGFR-3 humano y que comprende una cadena ligera que comprende el polipéptido de la SEC ID NO: 15 y una cadena pesada que comprende el polipéptido de la SEC ID NO:
15 16.

Todavía más preferiblemente, la presente invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que une VEGFR-3 humano y que comprende dos cadenas ligeras que comprenden el polipéptido de la SEC ID NO: 15 y
20 dos cadenas pesadas que comprenden el polipéptido de la SEC ID NO: 16.

Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno que compite con un anticuerpo de la invención para enlace a
25 VEGFR-3 humano.

Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que es un anticuerpo humano.

Preferiblemente, la invención proporciona un
5 anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, que es un anticuerpo humano diseñado por ingeniería.

Definiciones

El término "anticuerpo" como se usa en la presente
10 está propuesto para referirse a anticuerpos monoclonales los cuales pueden ser anticuerpos completamente humanos o anticuerpos humanos diseñados por ingeniería, así como también fragmentos de digestión, porciones especificadas y variantes de los mismos, que incluyen miméticos de
15 anticuerpo, porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o porción del mismo, que incluye anticuerpos de cadena única y fragmentos de los mismos, que retienen la capacidad para unirse al segundo dominio similar a Ig de VEGFR-3 humano.
20 Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo capaces de enlazarse específicamente al segundo dominio similar a Ig de VEGFR-3 humano abarcado por la presente invención incluyen fragmentos Fab (*por ejemplo*, por digestión de papaína), un fragmento Facb (*por ejemplo*, por digestión de plasmina), fragmentos
25 F(ab')₂ (*por ejemplo* por digestión de pepsina) y fragmentos

variables estabilizados por disulfuro (dsFv) o fragmentos variables de cadena única (scFv) generados por técnicas de biología molecular. Los fragmentos de anticuerpo también están propuestos para incluir, *por ejemplo*, anticuerpos suprimidos de dominio, diacuerpos y triacuerpos que retienen la capacidad para unirse al segundo dominio similar a Ig de VEGFR-3 humano.

Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada contiene tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR) y una región constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras de anticuerpo de cualquier especie vertebrada pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, nombrados kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes. La expresión de LCVR, como se usa en la presente, está propuesta para incluir tanto las regiones variables de cadenas ligera tipo kappa ($V\kappa$) como las regiones variables de cadenas ligeras tipo lambda ($V\lambda$). La región constante de cadena ligera está

comprendida de un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR incluyen regiones de hipervariabilidad de secuencia, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Para propósitos de la presente invención, las CDRs de LCVR son abreviadas LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y las CDRs de HCVR son abreviadas HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

Dependiendo de la secuencia de aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden ser asignados a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM. Varios de estos pueden además ser divididos en subclases (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos son llamados alfa (α), delta (Δ), épsilon (ϵ), gamma (γ), y mu (μ), respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tri-dimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. La presente invención incluye anticuerpos que caen en cualquiera de las clases o subclases mencionadas anteriormente (isotipos).

Como se usa en la presente, un "anticuerpo

monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *por ejemplo*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son sustancialmente idénticos excepto para mutaciones posibles que se originan naturalmente o variaciones post-traduccionales menores que pueden estar presentes. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico único (también conocido como determinante o epítope), los cuales como se muestran en la presente están contenidos en el segundo dominio similar a Ig de un VEGFR-3 de mamífero. Además, contrario a las preparaciones convencionales (policlonales) las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no está siendo construido como requiriendo producción del anticuerpo por cualquier método particular.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (como se describe en Kabat, *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th

Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH
Publicación No. 91-3242). El término "anticuerpo humano,"
como se usa en la presente, no se pretende para incluir
anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de
5 la línea germinal de otras especies de mamífero, tal como un
ratón, han sido injertadas en secuencias de armazón humanas.

Las modificaciones a la secuencia de aminoácido del
Anticuerpo 1 como se describe en la presente están incluidas
dentro del alcance de la presente invención, particularmente
10 en conjunto con mejoramientos en la afinidad de enlace y/o
otras propiedades biológicas de los anticuerpos. En este
contexto, el término "anticuerpo humano diseñado por
ingeniería", como se usa en la presente, se refiere a
anticuerpos adicionales que tienen propiedades funcionales
15 similares al Anticuerpo 1 (por ejemplo la capacidad para unir
VEGFR-3 humano a un epítipo que comprende P219 y V175) y el
cual tiene regiones de armazón que son sustancialmente
humanas o completamente humanas que rodean CDRs que se
derivan del Anticuerpo 1. Armazones sustancialmente humanas
20 en el contexto de la presente invención son aquellas que
tienen al menos 80% de identidad de secuencia a las regiones
de armazón del Anticuerpo 1. Preferiblemente, tales armazones
sustancialmente humanas tienen al menos aproximadamente 85%,
aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente
25 99% de identidad de secuencia a las regiones de armazón del

Anticuerpo 1. Las secuencias de línea germinal humana se describen en el documento WO 2007/044411. Por ejemplo, las armazones de cadena ligera de línea germinal pueden ser seleccionadas del grupo que consiste de: A11, A17, A18, A19, 5 A20, A27, A30, LI, L1I, L12, L2, L5, L15, L6, L8, O12, O2, y O8 y las regiones de armazón de cadena pesada de línea germinal pueden ser seleccionadas del grupo que consiste de: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VHI-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VH I-18, VH I-69, VH3-11, VH3-15, VH3-21, 10 VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, y VH5-5I.

Anticuerpos humanos diseñados por ingeniería derivados del Anticuerpo 1 pueden incluir deplecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de la secuencia del Anticuerpo 1. Sin embargo, el producto final 15 debe retener las características funcionales deseadas del Anticuerpo 1 (por ejemplo la capacidad para unir VEGFR-3 humano a un epítipo que comprende P219 y V175).

Anticuerpos humanos diseñados por ingeniería que tienen propiedades funcionales similares al Anticuerpo 1 20 pueden ser generados usando varios procedimientos diferentes, con cada procedimiento partiendo con un Anticuerpo 1 (es decir, un anticuerpo que tiene secuencias LCVR y HCVR como se muestra en la SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 10 respectivamente) como una plantilla o anticuerpo precursor para hacer 25 anticuerpos adicionales. En un primer procedimiento, las CDRs

del Anticuerpo 1 son injertadas en un armazón humano diferente que tiene una alta identidad de secuencia con las regiones de armazón del Anticuerpo 1. La identidad de secuencia de la nueva armazón en general será al menos 80%,
5 al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica con el armazón correspondiente en el Anticuerpo 1. Este injerto puede resultar en una reducción en afinidad de enlace comparada al Anticuerpo 1. Si este es el caso, el armazón puede ser retro-mutado al armazón del Anticuerpo 1 en
10 ciertas posiciones con base en el criterio específico publicado por Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991). La identificación de residuos para considerar retro-mutación se puede llevar a cabo como sigue: Cuando un aminoácido cae bajo cualquiera de las siguientes categorías,
15 el aminoácido de armazón de la secuencia de línea germinal humana que está siendo usada (armazón aceptora) se reemplaza por un aminoácido de armazón del armazón del Anticuerpo 1 (armazón donadora):

(a) el aminoácido en la región de armazón humana
20 del armazón aceptor es inusual para armazones humanas en tal posición, mientras el aminoácido correspondiente en el Anticuerpo 1 es típico para armazones humanas en tal posición;

(b) la posición del aminoácido es inmediatamente
25 adyacente a una de las CDRs; o

(c) cualquier átomo de cadena lateral de un aminoácido de armazón está dentro de aproximadamente 5-6 angstroms (centro-a-centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional.

Cuando cada uno de los aminoácidos en la región de armazón humana del armazón aceptor y el aminoácido correspondiente en el armazón del Anticuerpo 1 es inusual para armazones humanas en tal posición, tal aminoácido puede ser reemplazado por un aminoácido típico para armazones humanas en tal posición. Este criterio de retro-mutación permite recuperar la actividad del Anticuerpo 1.

En un segundo procedimiento, anticuerpos humanos diseñados por ingeniería derivados del Anticuerpo 1 los cuales retienen las propiedades funcionales del Anticuerpo 1, (por ejemplo la capacidad para unir VEGFR-3 humano a un epítipo que comprende P219 y V175), pueden ser generados mutando las CDRs del Anticuerpo 1 (ya sea aleatoriamente o en una forma desviada para evitar la degeneración del código de aminoácido) mientras se retienen las regiones de armazón del Anticuerpo 1. Preferiblemente, las mutaciones (deleciones, inserciones y/o sustituciones) en las secuencias de aminoácido de las CDRs de los Anticuerpos humanos diseñados por ingeniería derivados del Anticuerpo 1 están limitadas a un máximo de tres mutaciones, más preferiblemente dos

mutaciones o muy preferiblemente una mutación única en las secuencias CDR del anticuerpo humano diseñado por ingeniería cuando se compara con las secuencias CDR del Anticuerpo 1. Cuando más de una mutación está presente, las mutaciones
5 pueden ser distribuidas a través de las secuencias CDR en una variedad de diferentes formas. Por ejemplo, todas las mutaciones pueden ocurrir en una secuencia CDR única (por ejemplo LCDR1), cada mutación puede ocurrir en una secuencia CDR diferente o dos mutaciones se pueden encontrar en una
10 secuencia CDR y una tercera mutación encontrada en otra secuencia CDR. Esto resulta en la creación de una biblioteca combinatorial de los Anticuerpos humanos diseñados por ingeniería, en donde las secuencias CDR son mutadas en una o más posiciones como se describe anteriormente, mientras
15 retienen las regiones de armazón del Anticuerpo 1. La biblioteca puede ser seleccionada para variantes adicionales que tienen propiedades funcionales similares o mejoradas cuando se compara con el Anticuerpo 1.

Un procedimiento adicional para generar anticuerpos
20 humanos diseñados por ingeniería derivados del Anticuerpo 1 (y los cuales retienen las propiedades funcionales del Anticuerpo 1, por ejemplo la capacidad para unir VEGFR-3 humano a un epítoto que comprende P219 y V175) es combinar los dos procedimientos descritos anteriormente y hacer
25 cambios en tanto las armazones como las CDRs. En otras

palabras, después de injertar las CDRs del Anticuerpo 1 en un
armazón diferente, los residuos de armazón específicos pueden
ser retro-mutados además haciendo cambios en las CDRs. El
principio general de esta metodología se describe en Wu et
5 al. (1999), *J. Mol. Biol.* 294: 151-162.

Los cambios de aminoácido también pueden alterar
los procesos post-traduccionales de los anticuerpos humanos
diseñados por ingeniería, tales como cambiar el número o
posición de sitios de glicosilación.

10 Las variantes de sustitución pueden ser generadas
sustituyendo uno o más residuos de región hiper-variable del
Anticuerpo 1. Tal método para generar variantes
sustitucionales se conoce como maduración de afinidad usando
despliegue de fago. Varios sitios de región hipervariable
15 (por ejemplo, 6-7 sitios) son mutados para generar todas las
sustituciones de aminoácido posibles en cada sitio. Las
variantes de anticuerpo de este modo generadas son
desplegadas en una forma monovalente de partículas de fago
filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13
20 empacado dentro de cada partícula. Las variantes desplegadas
de fago son entonces seleccionadas por su actividad biológica
(por ejemplo, afinidad de enlace) como se describe en la
presente.

Los ensayos descritos en la presente pueden ser
25 usados para seleccionar anticuerpos humanos diseñados por

ingeniería derivados del Anticuerpo 1 para identificar aquellos anticuerpos que tiene las funciones *in vitro* e *in vivo* como se describe en la presente.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos aislados. Un anticuerpo aislado está sustancialmente libre de otros materiales y/o químicos celulares.

El término "epítotope", como se usa en la presente, se refiere a una región molecular particular en la superficie de un antígeno capaz de estimular una respuesta inmune y de enlazarse al anticuerpo específico producido por tal respuesta. Un epítotope puede ser un epítotope lineal (es decir, compuesto de residuos de aminoácidos contiguos todos contenidos dentro de un estiramiento corto único de secuencia) o puede ser un epítotope conformacional (es decir, compuesto de residuos de aminoácidos que están en partes disparadas de la secuencia lineal del antígeno, pero los cuales se llevan en conjunto para formar el sitio de enlace al anticuerpo una vez que el antígeno asume su estructura secundaria y terciaria apropiada). Típicamente, un epítotope está constituido de un número pequeño (por ejemplo 2 a 5) de residuos de aminoácidos claves y el rompimiento de estos residuos (por ejemplo por mutación a un residuo de aminoácido diferente) resulta en una reducción significativa o aún completa abolición del enlace entre el antígeno y el epítotope.

Anticuerpos o fragmentos del mismo enlazantes al antígeno que "compiten" con las moléculas descritas en la presente son aquellos que unen VEGFR-3 humano en el(los) sitio(s) que son idénticos a, o que se traslapan con, el(los) sitio(s) en los cuales las presentes moléculas se unen. Anticuerpos humanos de competición diseñados por ingeniería o fragmentos del mismo enlazantes al antígeno pueden ser identificados, por ejemplo, vía un ensayo de competición de anticuerpo. Por ejemplo, una muestra de VEGFR-3 humano purificado o parcialmente purificado se une a un soporte sólido. Un anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo monoclonal de prueba o fragmento enlazante al antígeno, con ya sea la prueba o un anticuerpo de la presente invención etiquetado, son entonces agregados. Si el anticuerpo etiquetado y el anticuerpo no etiquetado se unen para separar y pausar sitios en VEGFR-3, el anticuerpo etiquetado se unirá al mismo nivel sí o no el anticuerpo de competición sospechoso está presente. Sin embargo, si los sitios de interacción son idénticos o traslapantes, el anticuerpo no etiquetado competirá, y la cantidad de anticuerpo etiquetado unida al antígeno se reducirá. Si el anticuerpo no etiquetado está presente en exceso, no se unirá anticuerpo no etiquetado. Para propósitos de la presente invención, anticuerpos humanos de competición diseñados por ingeniería o fragmentos del mismo enlazantes al antígeno son

aquellos que reducen el enlace de los anticuerpos presentes por aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99%. Detalles de procedimientos para llevar a cabo tales ensayos de competición son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, páginas 567-569, ISBN 0-87969-314-2. Tales ensayos se pueden hacer cuantitativamente usando anticuerpos purificados. Una curva estándar se establece titulando un anticuerpo contra el mismo, es decir, el mismo anticuerpo se usa para tanto la etiqueta como el competidor. Se titula la capacidad de un anticuerpo monoclonal de competición no etiquetado o fragmento del mismo enlazante al antígeno para inhibir el enlace de la molécula etiquetada a la placa. Los resultados son trazados, y las concentraciones necesarias para lograr el grado deseado de inhibición de enlace se comparan.

El VEGFR-3 humano existe en dos formas, las cuales son generadas por transcriptos de ARNm de diferente longitud. El transcripto más largo codifica una proteína que contiene 65 residuos de aminoácidos extra al C término cuando se compara con la proteína codificada por el transcripto más corto, con la proteína más larga siendo la forma principal

detectada en los tejidos. Las dos variantes son idénticas en sus dominios extracelulares N-terminales. El término "VEGFR-3 humano", a menos que se declare de otro modo, se refiere a ambas variantes de VEGFR-3 humano de tipo nativo (es decir, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18) que se derivan de los transcriptos ARNm alterno.

El ácido nucleico y secuencias de aminoácido correspondientes de la región LCVR del Anticuerpo 1 son designados como SEC ID NOS: 4 y 5 respectivamente.

El ácido nucleico y secuencias de aminoácido correspondientes de la región HCVR del Anticuerpo 1 son designados en la presente como SEC ID NOS: 9 y 10 respectivamente.

El ácido nucleico y secuencias de aminoácido correspondientes de la cadena ligera del Anticuerpo 1 son designados en la presente como SEC ID NOS: 11 y 12 respectivamente. Residuos de aminoácidos 1-19 de la SEC ID NO: 12 constituyen una secuencia secretora útil en la expresión y extracción de la cadena ligera de varias líneas de células hospederas de mamífero, pero las cuales no están presentes en el anticuerpo maduro. La secuencia de aminoácido de la cadena ligera madura del Anticuerpo 1 es designada en la presente como SEC ID NO: 15.

El ácido nucleico y secuencias de aminoácido correspondientes de la cadena pesada del Anticuerpo 1 son

designados como SEC ID NOS: 13 y 14 respectivamente. Como en el caso de la secuencia para la cadena ligera, residuos de aminoácidos 1-19 de la SEC ID NO: 14 constituyen una secuencia secretora útil en la expresión y extracción de la

5 cadena pesada de varias líneas de células hospederas de mamífero, pero las cuales no están presentes en el anticuerpo maduro. La secuencia de aminoácido de la cadena pesada madura del Anticuerpo 1 es designada en la presente como SEC ID NO: 16.

10 La especificidad de un anticuerpo puede ser determinada con base en la afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (K_d), mide la intensidad de enlace entre un determinante antigénico y un

15 sitio de enlace al anticuerpo. La avidez es la medida de la intensidad de enlace entre un anticuerpo con su antígeno. La avidez está relacionada con tanto la afinidad entre un epítipo con su sitio de enlace al antígeno en el anticuerpo, como con la valencia del anticuerpo, lo cual se refiere al

20 número de sitios de enlace al antígeno de un epítipo particular. A menor valor del K_d , más fuerte la intensidad de enlace entre un determinante antigénico y el sitio de enlace al anticuerpo.

La presente invención también proporciona un

25 polinucleótido que codifica una cadena pesada de un

anticuerpo de la presente invención (por ejemplo Anticuerpo 1 - SEC ID NO: 13), o polinucleótidos que comprenden cualquiera de las regiones VH o una porción de los mismos, o cualquiera de las CDRs de VH, que incluyen cualquiera de las variantes de las mismas, de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo Anticuerpo 1). La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo Anticuerpo 1 - SEC ID NO: 11), o polinucleótidos que comprenden cualquiera de las regiones de VL o una porción de las mismas, o cualquiera de las CDRs de VH, que incluyen cualquiera de las variantes de las mismas, de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo Anticuerpo 1).

La invención también incluye vectores de expresión que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Vectores ejemplares incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, virus y ácidos nucleicos de fago u otras moléculas de ácido nucleico que son capaces de replicación en un huésped procariótico o eucariótico tal como una célula, *por ejemplo*, una célula de mamífero. Los vectores de expresión típicos contienen terminadores de traducción y transcripción, secuencias de iniciación, y promotores útiles para la regulación de la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Los vectores también pueden contener casetes de expresión genética que contienen una

secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del vector en tanto eucariotas como procariotas, es decir, vectores lanzadera y marcadores de selección para tanto sistemas procarióticos como eucarióticos. Los vectores típicamente contienen un marcador para proporcionar un rasgo fenotípico para selección de hospederos transformados tal como conferir resistencia a antibióticos tales como ampicilina o neomicina.

Los promotores adecuados incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles. Las secuencias/promotoras de control de expresión representativas incluyen el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, regiones promotoras y operadoras principales de fago lambda, la región de control de la proteína de cubierta *fd*, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de fosfatasa de ácido de levadura, por ejemplo, *Pho5*, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura, promotores derivados del citomegalovirus humano, promotor de metalotionina, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus de sarcoma Rous, promotor de polihedrina y promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus, y virus de simio, por ejemplo, los promotores tardío y temprano de SV40.

La invención también incluye hospederos no humanos

tales como células que contienen un polinucleótido o un vector de la invención. Por "hospedero" significa un organismo multicelular no humano o una "célula huésped", lo cual se refiere a una célula o población de células en las
5 cuales un polinucleótido o vector de la invención se introduce. Una célula hospedera de la presente invención puede ser una célula eucariótica o línea de célula, tal como una célula vegetal, animal, vertebrada, de mamífero, roedor, ratón primate o humano o línea celular. Células eucarióticas
10 adecuadas incluyen levadura y otras células de hongo, insecto, células vegetales, células humanas y células animales, que incluyen células de mamífero, tales como líneas de hibridoma, células COS, células NS0 y células CHO. Por "una población de células hospederas", significa un grupo de
15 células cultivadas en las cuales un polinucleótido o vector de la presente invención puede ser introducido y expresado. Cualquiera de las células hospederas las cuales soportarán la expresión de un polinucleótido o vector de la invención se pretenden.

20 Un hospedero de la presente invención también puede ser procariótico. Hospederos procarióticos adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI, y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como
25 *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*.

La invención también incluye métodos para producir un anticuerpo de la presente invención, el cual vincula cultivar una célula hospedera que expresa uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención, y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados como medicamentos en medicina humana, administrados por una variedad de rutas. Muy preferiblemente, composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la presente invención son para administración parenteral. Tales composiciones farmacéuticas pueden ser preparadas por métodos bien conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.) y comprenden un anticuerpo como se describe en la presente, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, los términos “inhibe” o “neutraliza” con respecto a la bioactividad de un anticuerpo de la invención significa la capacidad para sustancialmente antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, reducir, interrumpir, eliminar, detener, reducir o invertir una bioactividad de VEGFR-3 humano como se mide en el Ejemplo 4 o 5 en la presente.

Como se usa en la presente, los términos “trata” y “tratamiento” se refieren a tratamiento médico, en donde el

objeto es prevenir o reducir descendientemente (disminuir) un cambio fisiológico indeseado asociado con una enfermedad o trastorno. Resultados clínicos deseados o benéficos incluye alivio de síntomas, disminución de la extensión de una enfermedad o trastorno, estabilización de una enfermedad o trastorno (es decir, donde la enfermedad o trastorno no empeora), retardar o reducir el progreso de una enfermedad o trastorno, alivio o paliación de la enfermedad o trastorno, y remisión (sea parcial o total) de la enfermedad o trastorno, sea detectable o indetectable. "Tratamiento" puede también significar supervivencia prolongada comparada con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la enfermedad o trastorno así como también aquellos propensos a tener la enfermedad o trastorno.

Las composiciones de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo puede variar de conformidad con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción del anticuerpo para estimular una respuesta deseada en el

individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquier efecto perjudicial o tóxico del anticuerpo o porción del anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente benéficos.

5 La terapia puede ser "primera línea", *es decir*, como un tratamiento inicial en pacientes quienes no han tenido tratamientos anti-cáncer previos, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos; o "segunda línea", como un tratamiento en pacientes quienes han tenido un régimen de
10 tratamiento anti-cáncer, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos; o como "tercera línea", "cuarta línea", etc., tratamientos, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos.

 La terapia también puede ser dada a pacientes
15 quiénes han tenido tratamientos previos los cuales han sido parcialmente exitosos pero son intolerantes al tratamiento particular. La terapia puede también ser dada como un tratamiento adyuvante, *es decir*, para prevenir la recurrencia de cáncer en pacientes con enfermedad no detectable
20 actualmente o después de la remoción quirúrgica del tumor.

 Los cánceres tratados por la invención incluyen tumores primarios o secundarios o metastásicos que han metastatizados a través del sistema linfático (que incluye aquellos metastatizados de pulmón, mama o próstata).

25 Cánceres que pueden ser tratados incluyen tumores

que no son aún vascularizados, o no son aún sustancialmente vascularizados, así como también tumores vascularizados. Los cánceres pueden estar comprendidos de tumores no sólidos (tales como leucemias y linfomas) o pueden ser tumores sólidos.

Los tipos de cánceres a ser tratados con los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de ovario, eritroleucemia humana, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y cáncer de colon. Además, dado el papel de la trayectoria VEGF-C/VEGFR-3 en promover la linfangiogénesis y dado que, para muchos tipos de cánceres, el primer sitio de metástasis son nodos linfáticos, el bloqueo de la trayectoria VEGF-C/VEGFR-3 podría esperarse inhibe la metástasis del nodo linfático, por ejemplo de cáncer de mama, pancreático, gástrico o colorrectal (Roberts *et al.*, Cancer Res., 66(5), 2650-2657 (2006)).

El anticuerpo puede ser administrado solo (monoterapia), o en combinación con uno o más agentes o tratamientos terapéuticamente efectivos (terapia de combinación). El otro agente terapéuticamente efectivo puede ser conjugado al anticuerpo, incorporado en la misma composición como el anticuerpo, o puede ser administrado como una composición separada. El otro agente terapéuticamente efectivo o tratamiento, puede ser administrado previo a,

durante y/o después de la administración del anticuerpo. El otro agente terapéuticamente efectivo puede ser administrado para aumentar el efecto terapéutico del anticuerpo, o para reducir los efectos secundarios negativos del anticuerpo.

5 Los métodos de tratamiento descritos en la presente pueden ser usados para tratar cualquier mamífero adecuado, incluyendo primates, tales como monos y humanos, caballos, vacas, gatos, perros, conejos y roedores, tales como ratas y ratones. En una modalidad, el mamífero a ser tratado es
10 humano.

 Se observará por referencia a los siguientes ejemplos que el Anticuerpo 1 une un epítotope en VEGFR-3 humano que comprende P219 como el constituyente dominante del epítotope, V175 como un constituyente subordinado del epítotope y
15 L221 como un constituyente menor del epítotope. Además, se puede ver que el Anticuerpo 2 (un anticuerpo monoclonal de rata de referencia originado contra VEGFR-3 murino) une un epítotope en VEGFR-3 murino el cual comprende los residuos L219 y V221. Además, los ejemplos también demuestran que el
20 Anticuerpo 1 tiene alta afinidad para VEGFR-3 humano (56 pM), es capaz de bloquear el enlace del ligando VEGF-C a VEGFR-3, es capaz de bloquear la respuesta mitogénica estimulada por VEGF-C y es efectivo en modelos de injerto heterólogo *in vivo* de cáncer de ovario y HEL. Finalmente, también se puede ver
25 que el Anticuerpo 2 es efectivo en modelos de injerto

heterólogo de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, RCC, cáncer pancreático y cáncer de colon.

EJEMPLO 1

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser elaborados y purificados usando varios métodos adecuados que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una célula hospedera apropiada, tal como HEK 293 EBNA o CHO, es ya sea temporalmente o establemente transfectada con un sistema de
10 expresión para secretar anticuerpos usando una relación de cadena ligera predeterminada óptima a vector de cadena pesada o un sistema vector único que codifica tanto una cadena ligera (por ejemplo SEC ID NO: 12 para el Anticuerpo 1) como una cadena pesada (por ejemplo SEC ID NO: 14 para el
15 Anticuerpo 1). El medio clarificado en el cual el anticuerpo ha sido secretado es purificado usando cualquiera de las muchas técnicas comúnmente usadas. Por ejemplo, el medio puede ser convenientemente aplicado a una columna de Proteína A o G de Sefarosa FF que ha sido equilibrada con un
20 amortiguador compatible, tal como salina amortiguada de fosfato (pH 7.4). La columna se lava para remover componentes de enlace no específicos. El anticuerpo unido es eluido, por ejemplo, por gradiente de pH (tal como 0.1 M de amortiguador de fosfato de sodio pH 6.8 a 0.1 M de amortiguador de citrato
25 de sodio a pH 2.5). Se detectan las fracciones de anticuerpo,

tales como por SDS-PAGE, y después se combinan. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso propuesto. El anticuerpo puede ser concentrado y/o filtrado estéril usando técnicas comunes. Los agregados y multímeros solubles pueden ser efectivamente removidos por técnicas comunes, que incluyen exclusión de tamaño, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, o cromatografía de hidroxipatito. La pureza del anticuerpo después de estas etapas de cromatografía es mayor de 99%. El producto puede ser inmediatamente congelado a -70°C o puede ser liofilizado. Las secuencias de aminoácido de región variable y CDR (determinadas usando el método Kabat) para el Anticuerpo 1 se proporcionan abajo.

Tabla 1. Secuencias de Aminoácido de CDR de Cadena Ligera

mAb	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Anticuerpo 1	RASQSISSFLA (SEC ID NO: 1)	AASTRAT (SEC ID NO: 2)	QQYGRSLS (SEC ID NO: 3)

Pesada

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3
Anticuerpo 1	GNSATWN (SEC ID NO: 6)	RTYYRSKWNHDYAESVKS (SEC ID NO: 7)	GDSSSWYAFDY (SEC ID NO: 8)

Tabla 3. Secuencias de Aminoácido de Cadena Ligera y Cadena Pesada LCVR, HCVR

mAb	LCVR	HCVR	Cadena ligera (secuencia señal en los residuos 1- 19)	Cadena pesada (secuencia señal en los residuos 1- 19)
Anticuerpo 1	SEC ID NO: 5	SEC ID NO: 10	SEC ID NO: 12	SEC ID NO: 14

EJEMPLO 2

En los siguientes ejemplos, se describen experimentos los cuales conducen al aclaramiento del epítope en el receptor VEGFR-3 al cual se unen el Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2.

Producción de VEGF-C_{ΔNAC} y sR3-AP de ratón y humano.

Se genera VEGF-C_{ΔNAC} humano recombinante maduro como se describe en Pytowski, et al. (2005) J. Natl. Cancer Inst. 97(1):14-21. Las regiones extracelulares solubles de longitud completa (es decir, dominios Ig 1-7) de VEGFR-3 humano y de ratón (sR3) están fusionadas a ADNc que codifica la fosfatasa alcalina humana (AP) para generar la proteína de fusión sR3-AP (Persaud et al. (2004) J. Cell Science 117:2745-56; Pytowski, et al. (2005) J. Natl. Cancer Inst. 97(1):14-21).

Producción de sR3-AP quimérico humano-ratón y mutantes dirigidas al sitio de sR3-AP. Los constructos humano-ratón y ratón-humano quiméricos de los 3 dominios similares a inmuloglobulina N-terminal (Ig) de sR3-AP se

preparan usando técnica de PCR traslapante (Ho, *et al.* (1989), *Gene* 77:51-59) y son clonados en el vector de expresión AP (Persaud, *et al.*, *supra*; Pytowski, *et al.*, *supra*). La mutagénesis dirigida al sitio de constructos de sR3-AP se realiza usando el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuickChange II XL por instrucciones del fabricante (Stratagene). La presencia de sustituciones deseadas es verificada por secuenciamiento en ambas hebras de ADNc a través de la región mutada usando el analizador Genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) y el Kit de Secuenciamiento de Ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

Expresión de proteínas VEGFR-3 solubles: El ADNc que codifica regiones extracelulares de sR3-AP mutado y de tipo nativo es transfectado en células 293 FreeStyle™ (Invitrogen, #R79007) cultivadas en suspensión en un Medio de Expresión de 294 FreeStyle™ libre de proteína, químicamente definido (Invitrogen, #12338026). En algunos casos, el sR3-AP seleccionado es purificado usando cromatografía de afinidad de anticuerpo anti-AP como se describe previamente (Zhu, *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:3209-14) o por cromatografía de afinidad con Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 de mAbs inmovilizados descritos en la presente.

Normalización de proteínas sR3 en medio acondicionado (CM): El CM es ensayado para determinar la actividad AP usando el kit de Quimioluminiscencia SEAP Great

EscApe™ 2.0 (Clontech, Mountain View, CA) usando el
luminómetro Tropix TR7171 (Applied Biosystems, Foster City,
CA). El CM es diluido en proporción a su actividad AP en
salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene 1% de
5 albúmina de suero bovino (PBS-BSA) y se prueba nuevamente
para verificar la normalización por mediciones de la
actividad AP y por manchado Western.

Ensayos de enlace sR3-AP: Se transfirieron cien
(100) μ l de CM normalizado a placas microtituladoras de 96
10 cavidades revestidas con ya sea VEGF-C_{ΔNAC}, o anticuerpo de
prueba (200ng/cavidad). Después de 2 hrs de incubación, las
placas son lavadas 5 veces, y se detecta la unión sR3-AP por
quimioluminiscencia.

La especificidad de enlace del Anticuerpo 1 y un
15 anticuerpo monoclonal de rata de referencia contra VEGFR-3 de
ratón (designado "Anticuerpo 2") se prueban por ELISA usando
las porciones extracelulares inmovilizadas de ratón y VEGFR-3
(dominios Ig 1-7)- El anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 se unen
fuertemente y en una manera dependiente de la dosis a humano
20 y VEGFR-3 de ratón respectivamente. El Anticuerpo 1,
anticuerpo humano muestra ligera pero reproducible
reactividad cruzada con VEGFR-3 de ratón a concentraciones
que exceden 10 nM. En contraste, el Anticuerpo 2 falla al
demostrar cualquier enlace detectable a VEGFR-3 humano.

25 *Epítopes de Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 están*

completamente contenidos dentro del segundo dominio de VEGFR-3 similar a inmunoglobulina (Ig): Los sitios de enlace del ligando de todos los tres elementos de la familia del receptor VEGF están contenidos dentro de los tres dominios Ig N-terminal del dominio extracelular. La especificidad de especies del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 se utiliza para comprobar cuál de los primeros tres dominios Ig contienen los epítopes de estos anticuerpos. Las secuencias de ADN que codifican dominios 1-3 Ig de ratón y humano son intercambiados en varias combinaciones para formar los siguientes constructos de dominio extracelular VEGFR-3: i) humano tipo nativo; ii) ratón tipo nativo; iii) quimera 1 (Ig1 humano-Ig2 humano-Ig3 ratón); quimera 2 (Ig1 humano-Ig2 ratón-Ig3 ratón); (iv) quimera 3 (Ig1 ratón-Ig2 humano-Ig3 ratón) y (v) quimera 4 (Ig1 humano-Ig2 ratón-Ig3 humano). Los constructos se expresan como proteínas con fosfatasa alcalina (AP) Persaud, *et al.*, *supra*. Las proteínas codificadas se aíslan del medio acondicionado (CM) de células transfectadas temporalmente y normalizadas a igual concentración de proteína y actividad AP. VEGF-C_{ΔNAC} humano enlaza sR3-AP de ratón y humano con afinidad similar. De esta forma, la capacidad de varias quimeras de sR3-AP para enlazar VEGF-C_{ΔNAC} humano se prueba como un medio para determinar que plegado de proteína correcto es preservado en los receptores quiméricos. La capacidad del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 para enlazarse a

proteínas quiméricas 1 a 4 muestra que los epítopes del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 están completamente contenidas dentro del segundo dominio Ig (Ig2) de VEGFR-3 humano y de ratón respectivamente. Por ejemplo, el Anticuerpo 1 no se enlaza a la quimera 2 y quimera 4, el cual contiene la secuencia VEGFR3 de ratón en el dominio Ig 2. *Identificación de aminoácidos de VEGFR-3 que constituyen los epítopes del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2:* Se identifican las doce (12) posiciones dentro de la secuencia de aminoácido del segundo dominio Ig de VEGFR-3 que difiere entre las proteínas humanas y de ratón. Estas posiciones junto con los residuos en las proteínas humanas y de ratón se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

15

Posición	153	167	175	177	184	192	194	199	214	219	221
Humano	A	V	V	W	V	L	S	H	D	P	L
Ratón	S	I	A	H	L	R	P	R	N	L	V

Se usa la mutagénesis dirigida al sitio para cambiar individualmente cada uno de los aminoácidos específicos de especies en la secuencia humana y de ratón al ortólogo correspondiente de las especies opuestas; cada proteína mutada después se expresa en el contexto de proteínas sR3-AP que codifican el primero, segundo y tercer dominio Ig. El mapeo de epítopes se logra por dos

25

procedimientos complementarios. En el primer procedimiento, se mide la pérdida de enlace del Anticuerpo 1 específico a humano y el Anticuerpo 2 específico a ratón a su respectivo sR3-AP humano y ratón debido a sustituciones de aminoácido individual para los ortólogos de ratón o humano. En el
5 segundo procedimiento, se mide la ganancia de enlace del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 al sR3-AP de las especies opuestas mediadas por sustituciones de aminoácido individual a los ortólogos de ratón y humano. Un residuo se considera
10 como un fuerte candidato para constituir una parte de un epítope de un anticuerpo si las mutaciones descritas anteriormente conducen a la pérdida de enlace con el primer procedimiento y una ganancia de enlace con el segundo procedimiento. Para todas las proteínas mutantes, el enlace a
15 VEGF-C_{ΔNAC} se mide en paralelo para verificar nuevamente los grandes cambios en la estructura de proteína.

Los experimentos de enlace se lleva a cabo por triplicado y los resultados se calculan como el promedio y la desviación estándar de los tres experimentos por separado. De
20 las 12 sustituciones examinadas en el dominio Ig2 de sR3-AP humano, únicamente uno (V184L) conduce a la pérdida completa de enlace para tanto VEGF-C_{ΔNAC} como para el Anticuerpo 1. Este cambio es así considerado por perturbar la estructura completa del sR3-AP humano. La sustitución de V175A conduce a
25 aproximadamente 50% de pérdida de enlace tanto para VEGF-C

como para el Anticuerpo 1. La sustitución de P219L resulta en aproximadamente 75% de pérdida de enlace a VEGF-C y casi pérdida completa (~95%) de enlace al Anticuerpo 1. El cambio de L221 a V no afecta el enlace de sR3-AP humano a VEG-C, pero reduce el enlace al Anticuerpo 1 por aproximadamente 55%. Las sustituciones restantes no conducen a una pérdida sustancial de enlace para cualquiera de VRGF-C o Anticuerpo 1.

Cuando se examinan las mutaciones humanas a ratón individual en el sR3-AP para incrementar el enlace al Anticuerpo 1 específico a humano, se observa un incremento significativo sobre el enlace a sR3-AP de ratón de tipo nativo para las sustituciones A175V (~12 veces) y L219P (~60 veces). Ninguna de las otras sustituciones conduce a un incremento significativo de enlace por encima del antecedente.

El criterio se así fijado considerando un aminoácido por comprender un epítipo para el Anticuerpo 1 en donde la sustitución de ortólogo ratón a humano en sR3-AP humano puede significativamente reducir el enlace del Anticuerpo 1 mientras se reduce (pero NO suprime) o llega a afectar el enlace a VEGF-C_{ΔNAC}. Además, para un aminoácido que comprende un epítipo para el Anticuerpo 1, la sustitución de ortólogo humano a ratón en sR3-AP de ratón puede conducir a un enlace significativo al Anticuerpo 1. Para el Anticuerpo 1, este criterio se satisface por V175 y P219 de sR3-AP humano.

V184 se excluye debido a la sustitución en sR3-AP humano al ortólogo de ratón para suprimir tanto el enlace a VEGF-C_{ΔNAC} como para el Anticuerpo 1 mientras la sustitución correspondiente en sR3-AP de ratón al ortólogo humano en este punto no conduce al enlace del Anticuerpo 1. Cambiando la leucina 221 en sR3-AP humano a la correspondiente valina murina enlazada al Anticuerpo 1 por 55%. Sin embargo, la sustitución correspondiente en sR3-AP de ratón al ortólogo humano en este punto no conduce al enlace del Anticuerpo 1. Por lo tanto L221 puede hacer una contribución menor al epítipo del Anticuerpo 1 pero no cubre todos los criterios establecidos anteriormente.

Para estudiar el pale del residuo en la posición 221 además, las mutaciones P219L y L221V en sR3-AP humano se combinan en un constructo único. El enlace del mutante doble a Anticuerpo 1 es esencialmente suprimido comprado al mutante P219L único que retiene el 5% de enlace a sR3-AP humano.

Tomados juntos, estos resultados identifican P219 como el dominio y V175 como constituyente subordinado del epítipo del Anticuerpo 1 en VEGFR-3 humano y eleva la posibilidad que L221 también sea un componente menor del epítipo.

Después se realiza un examen para el cual los residuos del domino 2 Ig el VEGFR-3 de ratón constituye el epítipo del Anticuerpo 2 usando un método similar.

Nuevamente, se llevan a cabo experimentos de enlace por triplicado y los resultados se calculan como el promedio y desviación estándar de los tres experimentos por separado. De las doce sustituciones individuales que cambian el aminoácido de ratón en el correspondiente aminoácido de humano, cuatro sustituciones (H177W, P199H y N214D) significativamente reduce en enlace de sR3-AP de ratón a tanto a VEGF-C como al Anticuerpo 2. De forma interesante, las mutaciones en las posiciones 219 y 221 (L219P y V221L) reduce el enlace al Anticuerpo 2 pero no a VEGF-C. Las correspondientes mutaciones ratón a humano en VEGFR-3 humano en posiciones 219 y 221 (P219L y L221V) permite en enlace del Anticuerpo 2 al sR3-AP humano en niveles, respectivamente de aproximadamente 55 veces y 10 veces, mayor que el enlace del Anticuerpo 2 a la secuencia de humano de tipo nativo. También se demuestra que el enlace de las proteínas mutantes de ratón que contienen el aminoácido ortólogo humano en las posiciones 219 y 221 a VEGF-C_{ΔNAC} incrementa ligeramente o no es afectado mientras el enlace de estas proteínas mutantes al Anticuerpo 2 es ya sea suprimido (219) o reducido por aproximadamente 85% (221).

El criterio fijado considerando un aminoácido que comprende un epítipo para el Anticuerpo 2 es que la sustitución de ortólogo humano es sR3-AP de ratón significativamente reduce en enlace al Anticuerpo 2 mientras

reduce (pero NO suprime) o llega a no afectar el enlace a VEGF-C_{ΔNΔC}. Además, para un aminoácido que comprende un epítipo para el Anticuerpo 2, la sustitución de ortólogo ratón a humano en sR3-AP humano puede conducir a enlace
5 significante al Anticuerpo 2. Para el Anticuerpo 2, estos criterios son cubiertos por P219 y L221 del sR3-AP de ratón.

Otro método para expresar los datos para calcular el porcentaje de enlace máximo del Anticuerpo 2 a sR3-AP de ratón de tipo nativo que es reconstituido por cada una de las
10 mutaciones de ortólogo ratón a humano individuales dentro de la secuencia sR3-AP humana. Esto demuestra que sustituyendo individualmente P219L y L221V dentro de la secuencia de sR3-AP humana resulta en la reconstitución de aproximadamente 5% y 1% respectivamente del enlace máximo al Anticuerpo 2 visto
15 con sR3-AP de ratón de tipo nativo. Por lo tanto se concluye que L219 y V221 son constituyentes del epítipo del Anticuerpo 2.

Se puede observar que el Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 muy enlazados a epítopes similares en VEGFR-3 humano y VEGFR-3 de ratón respectivamente, con el residuo en la
20 posición 219 siendo el residuo clave en cada caso. Los datos en los siguientes ejemplos demuestran que tanto el Anticuerpo 1 como el Anticuerpo 2 son anticuerpos neutralizantes los cuales son capaces de bloquear la actividad de sus respectivos antígenos, así como también inhiben el
25 crecimiento del tumor en modelos de injerto heterólogo *in*

vivo. Estos datos proporcionan evidencias adicionales para demostrar que el nuevo epítotope en el dominio Ig2 de VEGFR-3 identificado en la presente, proporciona la característica ventajosa clave de ser un epítotope neutralizante. Anticuerpos
 5 enlazados al epítotope son de esta forma capaces de bloquear el enlace del ligando, la señalización VEGFR-3 e inhibir el crecimiento de tumor *in vivo*.

EJEMPLO 3: Mediciones de Afinidad (K_d) para anticuerpos anti- 10 VEGFR-3

Se miden cinéticos de enlace del Anticuerpo 1 por resonancia de plasmón de superficie en el biosensor BIACORE®2000 (BIACORE®, Piscataway, NY) a 20°C. Se inmoviliza el dominio extracelular soluble de VEGFR-3 humano (sR3-AP) en
 15 un chip sensor y el Anticuerpo 1 se inyecta sobre la superficie del sensor a concentraciones de entre 0.8 y 6.25 nM. Se evalúan los sensogramas usando el programa BIA Evaluation 3.2 para determinar la asociación (k_a) y la disociación (k_d). La constante de disociación (K_d) se calcula
 20 de las relaciones k_a y k_d usando la ecuación: $K_d = k_a/k_d$. El análisis cinético BIAcore proporciona una K_d de 56 pM para el enlace del Anticuerpo 1 a sR3-AP inmovilizado. De esta forma, el Anticuerpo 1 tiene una afinidad extremadamente alta para VEGFR-3 humano en donde la afinidad es casi 2 órdenes de
 25 magnitud mayor que de sR3-AP para VEGF- C_{ANAC} .

EJEMPLO 4: Bloqueo del enlace VEGF-C a VEGFR-3 por anticuerpos anti-VEGFR-3

Para medir la capacidad de anticuerpos VEGFR-3 para bloquear VEGF-C enlazado a VEGFR-3 humano, se utiliza un ensayo de bloqueo VEGF-C competitivo. Se mezclan anticuerpos o partículas de fago soluble a una concentración de 0.001 µg/ml a 5 µg/ml con 50 ng de sR3-AP, se incuban a temperatura ambiente por 1 hora y se transfieren a placas microtituladoras de 96 cavidades revestidas con VEGF-C_{ΔNAC} (200 ng/cavidad). Después de 2 horas adicionales, las placas se lavan cinco veces y se agrega fosfato de p-nitrofenilo (Sigma) para cuantificar las moléculas sR3-AP enlazadas a OD_{405nm}. El IC₅₀, es decir se calcula la concentración de Fab o IgG requerido para 50% de inhibición de sR3-AP enlazado a VEGF-C_{ΔNAC}. Las formas Fab e IgG del Anticuerpo I fuertemente bloquean el enlace de sR3-AP a VEGF-C_{ΔNAC} inmovilizado con un IC₅₀ de 2 y 1.3 nM, respectivamente. En contraste, un anticuerpo de control el cual se dirige al receptor IGF humano y obtenido de la biblioteca del mismo fago es inactivo.

EJEMPLO 5: Inhibición de respuesta mitogénica estimulada por VEGF-C_{ΔNAC} por el Anticuerpo 1

Para probar la capacidad del Anticuerpo 1 para inhibir la transducción de señal mediada por VEGFR-3, se

prepara una línea celular NIH-3T3 que expresa una forma quimérica de VEGFR-3 el cual fusiona el dominio extracelular de VEGFR-3 humano con la transmembrana y dominios citoplásmicos de cFMS humano. No es detectada la expresión endógena de VEGFR-3 por las células parentales, y la localización del receptor quimérico en la membrana del plasma se muestra por análisis FACS. Las células FMS de VEGFR-3 (5×10^3 células/cavidad) se colocan en placas de cultivo de tejido de 96 cavidades (Wallac, Gaithersburg, MD) en 200 ml de medio libre de suero y se incuban a 37°C por 72 horas. Se agrega anticuerpo hasta 20 nM y se pre-incuba a 37°C por 1 hora, después de lo cual se agrega VEGF-C_{ΔNΔC} a una concentración final de 20 ng/ml. Después de 18 horas de incubación, se agrega 0.25 mCi de tiamida tritiada ($[^3\text{H}]$ -TdR) (Amersham) a cada cavidad y se incuba por 4 horas adicionales. Las células se colocan en hielo, se lavan una vez con medio que contiene el suero, se incuban por 10 minutos a 4°C con 10% de TCA, y se solubilizan en 25 ml de SDS al 2%. Se determina la radioactividad incorporada en un contador de escintilación (Contador de Escintilación Microbeta, Modelo 14500, Wallac). La incorporación de $[^3\text{H}]$ -TdR por las células NIH-3T3 que expresa cFMS de VEGFR-3 se estimula por al menos tres veces por la adición de VEGF-C_{ΔNΔC}. La respuesta mitogénica es específicamente bloqueada en una manera dependiente de la dosis por el Anticuerpo 1, con un

valor IC₅₀ de 5 nM.

EJEMPLO 6: Anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-3 en un modelo de injerto heterólogo subcutáneo de línea celulares de carcinoma de ovarios de humano

En este experimento, el Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 de anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-3 se usan solos o en combinación en injertos heterólogos de línea celulares de carcinoma de ovario humano OVCAR-8 (NCI-60, Programa de Terapéuticos de Desarrollo, NCI/NIH) en ratones SCID inmunodeficientes. OVCAR-8 es una de muy pocas líneas celulares de carcinoma humano que expresan VEGFR-3 humano. La especulación en este experimento es que el Anticuerpo 2 puede bloquear la angiogénesis y linfangiogénesis en el estroma de ratón del tumor que crece mientras no tiene efecto en el tumor. En contraste, se espera que el Anticuerpo 1 no actúe únicamente en las células de carcinoma humana.

Las células OVCAR-8 se inyectan s.c. en el lado izquierdo de 75 ratones atímicos hembra a 1×10^7 células/ratón. Cuando los tumores alcanzan $\sim 180\text{mm}^3$, 13 días después del implante celular, los ratones se seleccionan al azar y se dividen en cinco grupos de tratamiento (n = 12): Control salina USP, 0.5 ml/dosis; IgG de rata a 40 mg/kg; Anticuerpo 1 a 40 mg/kg; Anticuerpo 2 a 40 mg/kg y Anticuerpo 1 a 40 mg/kg + Anticuerpo 2 a 40 mg/kg. Se proporcionan

controles y mAbs anti-VEGFR-3 i.p. en un esquema Lunes-Miércoles-Viernes. Se registran las mediciones del tumor dos veces a la semana. Se calcula el T/C% para cada grupo de tratamiento como la proporción del volumen de tumor relativo de cada grupo de tratamiento contra el volumen de tumor relativo del grupo de control de salina. Se usa ANOVA RM hasta el día 41 para comparar el crecimiento del tumor entre los grupos de tratamiento.

El Anticuerpo 2 significativamente inhibe el crecimiento de tumores OVCAR-8 con un T/C% del 71% ($P=0.0299$). El Anticuerpo 1 tiene una tendencia hacia la eficacia en este modelo (T/C% es 74%) pero el grado de inhibición de tumor no alcanza significancia ($P > 0.05$). Esto puede ser debido al amplio intervalo de volúmenes de tumor en el Día 41 en este grupo ($335\text{--}1504\text{mm}^3$) que puede prevenir este grupo de alcanzar significancia estadística.

La combinación del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 juntos mejoran el efecto inhibitorio del tumor del Anticuerpo 2 (T/C% es 47% y el efecto de combinación alcanza significancia comparado ya sea con el anticuerpo solo ($P \leq 0.0358$)).

El Anticuerpo 2 significativamente inhibe el crecimiento de tumores OVCAR-8 mientras el Anticuerpo 1 parece no ser eficaz en este modelo son alcanzar significancia estadística. Sin embargo, ya que la combinación

de los dos anticuerpos monoclonales significativamente inhibe el crecimiento del tumor OVCAR-8 comparado a la monoterapia del Anticuerpo 2, se concluye que el Anticuerpo 1 demuestra eficacia terapéutica en este experimento. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención demuestran eficacia anti-tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de ovario.

EJEMPLO 7: Anticuerpo 1 mAb anti-VEGFR-3 en el modelo de injerto heterólogo subcutáneo de célula eritroleucemia (HEL) humana

En el siguiente ejemplo, se mide el efecto anti-tumoral significativo para el Anticuerpo 1 en el modelo de injerto heterólogo subcutáneo de célula eritroleucémica (HEL) humano.

Ratones Nu/nu (hembras, 7-8 semanas) alojados de 5-6 por jaula son inyectados subcutáneamente con 5×10^6 células HEL/ratón. Cuando los tumores alcanzan aproximadamente 400 mm³, los ratones se seleccionan al azar por volumen de tumor en uno de los cuatro grupos de tratamiento (n=11/grupo):

- 1) salina USP, 10 ml/kg
- 2) Anticuerpo 1, 60 mg/kg (dosis de carga de 150 mg/kg en el Día 1)
- 3) Anticuerpo 1, 20 mg/kg (dosis de carga de 50 mg/kg en el Día 1)
- 4) Anticuerpo 1, 6 mg/kg (dosis de carga de 15

mg/kg en el Día 1)

El Anticuerpo 1 se prepara en salina USP. Los tratamientos se administran i.p. dos veces a la semana, a 10 ml de solución de dosificación/kg de peso corporal. La primera dosis, la dosis de carga, se administra en el Día 1, seguido por la dosis de mantenimiento administrada dos veces a la semana durante la duración del estudio. Se miden los volúmenes de tumor dos veces a la semana. Se registran los pesos corporales al menos dos veces a la semana durante la duración del estudio. Se calcula el T/C% para cada grupo de tratamiento en el Día 18 como la proporción del volumen de tumor relativo de cada grupo de tratamiento contra el volumen de tumor relativo del grupo control de salina (Tabla 5). Se comparan el crecimiento de tumor y el cambio de peso corporal en los grupos de tratamiento por Mediciones Repetidas ANOVA.

El tratamiento con el Anticuerpo 1 resulta en una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de tumor HEL, con 60 mg/kg del Anticuerpo 1 significativamente inhiben el crecimiento de tumor ($p=0.0031$). No existe efecto en el peso corporal con el tratamiento del Anticuerpo 1 en este estudio (Tabla 5). Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención demuestran eficacia anti-tumoral en un modelo *in vivo* de HEL, mientras resulta en efectos secundarios adversos mínimos en el modelo.

Tabla 5

5		T/C% En el Día 18	ANOVA RM para Volumen de Tumor	Cambio en peso Corporal % Medio Final	ANOVA RM para peso corporal
	Control de Salina			6.6	
	Anticuerpo 1 60 mg/kg	52.5	0.0031	4.6	0.21
	Anticuerpo 1 20 mg/kg	69.6	0.13	3.2	0.20
	Anticuerpo 1 6 mg/kg	81.9	0.39	4.6	0.41

EJEMPLO 8: Anticuerpo 2 mAb Anti-VEGFR-3 en combinación con
cisplatino en el modelo de injerto heterólogo de carcinoma de
célula escamosa CAL27

Para probar la actividad de anticuerpos anti-VEGFR-3 en cáncer de cabeza y cuello, se usó el modelo de injerto heterólogo CAL27. La suspensión celular de CAL27, a 1×10^7 células/ratón, se inyectó s.c. en el flanco izquierdo de 60 ratones atímicos hembra. Cuando los tumores alcanzaron $\sim 180\text{mm}^3$, ocho días después del implante de célula, los ratones son aleatorizados y divididos en cuatro grupos de tratamiento (n = 12): 1.) USP de control salino, 0.5 ml i.p., 3 días por semana 2.) Anticuerpo 2 a 40 mg/kg, 3 días por semana 3.) cisplatino a 7 mg/kg, q7d 4.) Anticuerpo 2 a 40 mg/kg, 3 días por semana + cisplatino a 7 mg/kg, q7d.

Se registraron las mediciones de tumor dos veces semanalmente; RM ANOVA hasta el Día 61 se usó para comparar el crecimiento del tumor entre los grupos de tratamiento. Se

usaron pruebas de Chi Cuadrada para probar la significancia estadística en el número de regresiones de tumor entre los grupos de tratamiento.

La monoterapia usando el Anticuerpo 2 o cisplatino
5 inhibe significativamente el crecimiento de tumores CAL27 comparado con el USP de control salino ($P \leq 0.0077$). Los valores T/C% son 55% y 39% para el Anticuerpo 2 y para cisplatino, respectivamente. La terapia de combinación con tanto el Anticuerpo 2 y cisplatino resulta en inhibición
10 significativa de crecimiento de tumor cuando se compara con la monoterapia ($P \leq 0.0322$). El efecto de terapia de combinación es mayor que el aditivo como se determina por el Método de Producto Fraccional. Por consiguiente, un anticuerpo anti-VEGFR-3 que se une a un epítipo en el dominio Ig2 de VEGFR-3
15 demuestra la eficacia anti-tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de cabeza y cuello ya sea como una monoterapia o en combinación con cisplatino.

**EJEMPLO 9: Anticuerpo 2 de mAB Anti-VEGFR-3 en combinación
20 con 5-Fluorouracilo/Leucovorina en un modelo de injerto heterólogo de cáncer de mama MDA-MB-231**

Para probar la actividad de anticuerpos anti-VEGFR-3 en cáncer de mama, se usó el modelo de injerto heterólogo MDA-MB-231. Ratones atímicos NIH nu/nu (hembras de 8
25 semanas) se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla de

grasa mamaria con 6×10^6 de células MDA-MB-231 en 0.4ml (1:1 p/matrigel). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 300 mm³, los ratones son aleatorizados por tamaño del tumor en los siguientes grupos de tratamiento (n=12): 1) USP
5 salina 10 µl/g, 3 veces por semana 2) 40 mg/kg de Anticuerpo 2, 3 veces por semana 3) 125 mg/kg 5FU (5-Fluorouracilo) + 62 mg/kg LV (Leucovorina), una vez por semana 4) Anticuerpo 2 a 40 mg/kg, 3 veces por semana + 5FU/LV a 125 mg/kg y 62 mg/kg, respectivamente, una vez por semana. Todos los
10 reactivos se prepararon el día del tratamiento y administraron i.p. El tratamiento citotóxico se inició un día previo al inicio del tratamiento de Anticuerpo.

Una comparación de los volúmenes del grupo de salina de control contra los volúmenes de tumor de los
15 ratones tratados, mostró significativa inhibición de crecimiento del tumor con la administración de un Anticuerpo 2 o Anticuerpo 2 + 5FU/LV (véase Tabla 6). Mientras los efectos de la combinación del Anticuerpo 2 + 5FU/LV no son mayores que de las monoterapias, existe una tendencia de
20 efectos antitumorales incrementados para la combinación. Por consiguiente, un anticuerpo anti-VEGFR-3 que se une a un epítipo en el dominio Ig2 de VEGFR-3 demuestra eficacia anti-tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de mama (comparado con la salina de control) ya sea como una monoterapia o en
25 combinación con 5FU/LV.

Tabla 6

	Volúmenes de Tumor	
	valor ¹ p	T/C%
Anticuerpo 2 v. USP salina	p=0.04	49
5FU/LV v. USP salina	p=0.17	52
Anticuerpo 2 + 5FU/LV v. USP salina	p<0.01	28
Anticuerpo 2 v. Anticuerpo 2 + 5FU/LV	p=0.09	57
5FU/LV v. Anticuerpo 2 + 5FU/LV	p=0.09	54

¹ RM ANOVA hasta el Día 34

EJEMPLO 10: Anticuerpo 2 de mAB Anti-VEGFR-3 solo y en combinación con Docetaxel en un modelo de injerto heterólogo de cáncer de pulmón NCI-H292

Para probar la actividad de anticuerpos anti-VEGFR-3 en cáncer de pulmón, se usó el modelo de injerto heterólogo NCI-H292. Ratones Nu/nu (hembras, 7-8 semanas de edad) se inyectaron subcutáneamente con 2×10^6 NCI-H292 células/ratón. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 300 mm³, los ratones son aleatorizados por tamaño del tumor en los siguientes grupos de tratamiento (n=15): 1) USP salina a 10 µl/g, 3 veces por semana, i.p., comenzando en el día 2. 2) Anticuerpo 2 a 40 mg/kg, 3 veces por semana, i.p., comenzando en el día 2. 3) Docetaxel a 12 mg/kg, q7d, comenzando en el día 1. 4) Docetaxel a 12 mg/kg, q7d, comenzando en el día 1 más Anticuerpo 2 a 40 mg/kg, 3 veces por semana, comenzando en el día 2.

Se midieron los volúmenes del tumor aproximadamente dos veces por semana y se registraron los pesos corporales al

menos dos veces por semana por la duración del estudio. Al sacrificio, los ratones son eutanizados por asfixia por CO₂. El T/C% es calculado para cada grupo de tratamiento como la relación del volumen de tumor relativo en los grupos experimentales contra el grupo de control. El crecimiento del tumor y pesos corporales se comparan con el grupo de control por mediciones repetidas ANOVA hasta el Día 26.

El tratamiento con un Anticuerpo 2 y docetaxel inhibe significativamente el crecimiento de tumor NCI-H292 con % de valores T/C de 74% y 49%, respectivamente. La terapia de combinación del Anticuerpo 2 y docetaxel incrementa significativamente la eficacia antitumoral comparada con ya sea monoterapia con un % T/C% de 24%. Por consiguiente, un anticuerpo anti-VEGFR-3 que se une a un epítipo en el dominio Ig2 de VEGFR-3 demuestra eficacia anti-tumoral en un modelo *in vivo* adicional de cáncer de pulmón ya sea como una monoterapia ($p < 0.0001$) o en combinación con Docetaxel ($p < 0.0001$).

EJEMPLO 11: Anticuerpo 2 de mAB Anti-VEGFR-3 en un Modelo de Injerto Heterólogo de Células renales de Carcinoma Humano SK-RC-29 (RCC)

Para probar la actividad de anticuerpos anti-VEGFR-3 en RCC, se usó el modelo de injerto heterólogo de carcinoma de células renales humanas SK-RC-29. Se implantaron s.c. ratones nu/nu atímicos hembra ($n = 12$ por grupo) con 2×10^6

células SK-RC-29 RCC por ratón. Las células son inyectadas como una mezcla en membrana de basamento 1:1 Matrigel® (Vt = 0.4 ml). Cuando los tumores alcanzaron 200 - 250 mm³, los ratones son aleatorizados en grupos y se inicia la dosificación i.p. con grupo de control que recibe USP Salina (500 µl/inyección) y grupo de Anticuerpo 2 que recibe 60 mg/kg por la primera dosis y 40 mg/kg en todas las dosis subsecuentes. Las mediciones de volumen de tumor se registraron dos veces semanalmente, por 43 días. Se tomaron muestras representativas del tumor ($n = 4$ por grupo de tratamiento) al día 48 (término del estudio) para análisis histológico. Para determinar la significancia de los efectos anti-tumorales entre los grupos de tratamiento, se realizó análisis estadístico usando Mediciones Repetidas (RM) de ANOVA. La pérdida de peso debido a toxicidad de anticuerpo no ocurre en algunos de los grupos de tratamiento como se mide al día 47. En efecto, el peso de los ratones tratados con un Anticuerpo incrementó por aproximadamente 5.5% durante el curso del estudio.

Para valorar la eficacia anti-tumoral y calcular los % de valores T/C, todos los grupos de tratamiento son comparados con el ratón de control hasta el día 32. El Anticuerpo 2 proporciona un % T/C de 62% ($p=0.012$); esto demuestra la inhibición del crecimiento de carcinoma de células renales en un modelo de injerto heterólogo subcutáneo

con efectos secundarios mínimos adversos.

EJEMPLO 12: Anticuerpo 2 de mAB Anti-VEGFR-3 en Injertos Heterólogos de Carcinoma Pancreático BxPC-3

5 Para probar la actividad de anticuerpos anti-VEGFR-3 en carcinoma pancreático, se usó el modelo de injerto heterólogo de carcinoma pancreático BxPC-3. Ratones atímicos hembra nu/nu ($n = 36$) se inyectaron s.c. con 2×10^6 células BxPC-3 pancreáticas humanas/ratón mezcladas en 1:1 de
10 Matrigel. Cuando los tumores alcanzaron $\sim 350\text{mm}^3$, los animales se separaron en tres grupos de tratamiento ($n = 10$): 1) USP salina. 2) Anticuerpo 2 de mAb a 10mg/kg. 3) Anticuerpo 2 de mAb a 40mg/kg. Todos los tratamientos se administraron i.p. tres veces por semana a 0.1ml/10g de peso corporal. Las
15 mediciones de volumen de tumor se registraron dos veces semanalmente, por seis semanas.

El tratamiento de Anticuerpo2 inhibe el crecimiento de tumores BxPC-3 en una manera dependiente de la dosis. Al final del estudio al Día 40, los valores T/C son 75%
20 ($p=0.042$) y 56% ($p=0.002$) para los grupos de dosis 10mg/kg y 40mg/kg, respectivamente.

EJEMPLO 13: Anticuerpo 2 de mAB Anti-VEGFR-3 en combinación con Oxiplatino en Injertos Heterólogos de Colon HT-29

25 Para probar la actividad de anticuerpos anti-VEGFR-

3 en cáncer de colon, se usó el modelo de injerto heterólogo de colon HT-29. La suspensión de células HT-29, a 5×10^6 /ratón, se inyectó s.c. en el flanco izquierdo de 60 ratones atímicos hembra. Cuando los tumores alcanzaron
5 $\sim 180\text{mm}^3$, ocho días después del implante de célula, los ratones son aleatorizados y divididos en cuatro grupos de tratamiento ($n = 12$): 1) USP de control salino, 0.5ml i.p., tres veces por semana. 2) Anticuerpo 2 a 40mg/kg, tres veces por semana. 3) oxiplatino a 12mg/kg, q7d. 4) Anticuerpo 2 a
10 40mg/kg, tres veces por semana + oxiplatino a 12mg/kg, q7d.

Se registraron las mediciones de tumor dos veces semanalmente; se usó RM ANOVA para comparar el crecimiento del tumor entre los grupos de tratamiento. El Anticuerpo 2 solo no inhibe significativamente el crecimiento de los
15 tumores HT-29; el anticuerpo tiene una tendencia de eficacia con un T/C% de 80%. La terapia de combinación con tanto Anticuerpo 2 como oxiplatino inhibe significativamente el crecimiento de tumores HT-29 comparados con control o ya sea monoterapia ($P \leq 0.0280$) con un T/C% de 47%. Por
20 consiguiente, un anticuerpo anti-VEGFR-3 que se une a un epítipo en el dominio Ig2 de VEGFR-3 demuestra eficacia anti-tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de colon cuando se usa en combinación con oxiplatino.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

5 1. Un anticuerpo o porción del mismo enlazante al
antígeno, caracterizado porque específicamente se une a
VEGFR-3 humano que comprende un LCDR1 de la SEC ID NO 2, una
LCDR2 de la SEC ID NO 2, una LCDR3 de la SEC ID NO 3, una
HCDR1 de la SEC ID NO 6, una HCDR2 de la SEC ID NO 7 y una
10 HCDR3 de la SEC ID NO 8.

 2. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al
antígeno de conformidad con la reivindicación 1,
caracterizado porque comprende una región variable de cadena
ligera de la SEC ID NO: 5 y una región variable de cadena
15 pesada de la SEC ID NO: 10.

 3. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al
antígeno de conformidad con la reivindicación 1 o 2,
caracterizado porque el anticuerpo comprende una cadena
ligera de la SEC ID NO: 15 y una cadena pesada de la SEC ID
20 NO: 16.

 4. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al
antígeno de conformidad con la reivindicación 3,
caracterizado porque el anticuerpo comprende dos cadenas
ligeras de la SEC ID NO: 15 y dos cadenas pesadas de la SEC
25 ID NO: 16.

5. Un anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 caracterizado porque:

a) el enlace del anticuerpo a VEGFR-3 humano se reduce por al menos 90% mutando ligeramente Pro-219 de VEGFR-3 humano a Leu; y

b) el enlace del anticuerpo a VEGFR-3 humano se reduce por al menos 50% mutando ligeramente Val-175 de VEGFR-3 humano a Ala.

6. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el enlace del anticuerpo a VEGFR-3 humano se reduce por al menos 50% mutando ligeramente Leu-221 de VEGFR-3 humano a Val.

7. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque también se une a un VEGFR-3 mutante de ratón de la SEC ID NO. 20 y un VEGFR-3 mutante de ratón de la SEC ID NO. 21, en donde el enlace al VEGFR-3 mutante de ratón de la SEC ID NO. 20 se incrementa por más de 50-veces cuando se compara con el enlace a VEGFR-3 de ratón tipo nativo (SEC ID NO. 19) y el enlace al VEGFR-3 mutante de ratón de la SEC ID NO. 21 se incrementa por más de 10-veces cuando se compara con el enlace a VEGFR-3 de ratón tipo nativo.

8. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el anticuerpo tiene un K_d de 1×10^{-9} M a 5.6×10^{-11} M para VEGFR-3 humano como se mide por resonancia de plasmón de superficie en un biosensor BIACORE® 2000 a 20°C.

9. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el anticuerpo inhibe el enlace de VEGF- $C_{\Delta NAC}$ humano (SEC ID NO: 22) a VEGFR-3 humano con un IC_{50} de 2 nM a 1.3 nM.

10. El anticuerpo, o porción del mismo enlazante al antígeno, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el anticuerpo inhibe la respuesta mitogénica estimulada por VEGF- $C_{\Delta NAC}$ con un IC_{50} de 10 nM a 5 nM.

11. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Una composición farmacéutica como se reivindica de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque la composición opcionalmente contiene al menos otro ingrediente terapéutico.

13. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso como un medicamento.

14. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en el tratamiento de cáncer de ovario, eritroleucemia humana, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon y metástasis de nodo linfático.

15. El anticuerpo o porción del mismo enlazante al antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en combinación con un agente anticancerígeno adicional seleccionado de cisplatino, 5-fluorouracilo, leucovorina, oxiplatino y docetaxel para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-3, composiciones farmacéuticas que
5 contienen los anticuerpos y usos de los anticuerpos en el tratamiento de enfermedades.

X18726SequenceListingJUL2011ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company
Pytowski, Bronislaw
Zayek, Nathalie
Persaud, Krishnadatt

<120> ANTI-VEGFR-3 ANTIBODY COMPOSITIONS

<130> X18726

<150> 61/380432
<151> 2010-09-07

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu Ser
1 5

<210> 4
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctctagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaagct cctcatctat gctgcatcca ccagggccac tggcatccca 180

X18726SequenceListingJUL2011ST25

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgctgtcta ttactgtcag cagtatgggc gctcactctc tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagggtcaa a 321

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Asn Ser Ala Thr Trp Asn
1 5

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Asn His Asp Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Lys Ser

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Gly Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac tctctcactc 60
 acctgtgccca tctccgggga cagtgtctct ggcaacagtg ctacttgga ctggatcagg 120
 cagtcccat cgcgaggcct tgagtggctg ggaaggacat attacaggtc caagtggaat 180
 catgattatg cagaatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
 cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
 aggggtgata gcagcagctg gtacgccttt gactactggg gccagggcac cctggtcacc 360
 gtctcaagc 369

<210> 10
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Gly Asn
 20 25 30

Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Asn His Asp Tyr Ala
 50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 702
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
atgggatggt catgtatcat ctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagaa 60
attgtgttga cgcagtctcc aggcaccctg tctttgtctc taggggaaag agccaccctc 120
tcctgcaggg ccagtcagag tattagcagc agcttcttag cctggtagca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaagctcct catctatgct gcatccacca gggccactgg catcccagac 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 300
gaagattttg ctgtctatta ctgtcagcag tatgggtcgct cactctcttt cggcggaggg 360
accaagggtg aggtcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 12
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly
100 105 110

Arg Ser Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 13
<211> 1419
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
atgggatggt catgtatcat ctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcacag 60
gtacagctgc agcagtcagg tccaggactg gtgaagccct cgcagactct ctactcacc 120
tgtgccatct ccggggacag tgtctctggc aacagtgcta cttggaactg gatcaggcag 180
tccccatcgc gaggccttga gtggctggga aggacatatt acaggtccaa gtggaatcat 240
gattatgcag aatctgtgaa aagtcgaata accatcaacc cagacacatc caagaaccag 300

X18726SequenceListingJUL2011ST25

ttctccctgc agctgaactc tgtgactccc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcaagg	360
ggtgatagca gcagctggta cgcctttgac tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc	420
tcaagcgcta gcaccaaggg cccatcgggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc	480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag	600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt	720
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	780
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg	840
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	900
aactggtatg tggacggcgt ggagggtgat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccaaga ctggctgaat	1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg	1140
gaggagatga ccaagaacca agtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1260
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctattcca agctcaccgt ggacaagagc	1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggcaaatga	1419

<210> 14
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg
 50 55 60

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Asn His
65 70 75 80

Asp Tyr Ala Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr
85 90 95

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Ala
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Val 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> 16
<211> 453
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Gly Asn
20 25 30

Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Asn His Asp Tyr Ala
50 55 60

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 17
<211> 1363
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
1 5 10 15

Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
20 25 30

Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
35 40 45

Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Ala Trp Pro Gly Ala
50 55 60

Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser Glu Asp Thr Gly Val
65 70 75 80

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro Tyr Cys Lys Val Leu
 85 90
 Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Val Cys Tyr
 100 105 110
 Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Ser
 115 120 125
 Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe Ile Asn Lys Pro Asp
 130 135 140
 Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp Val Pro Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser Gln Ser Ser Val Leu
 165 170 175
 Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp Arg Arg Gly Met Leu
 180 185 190
 Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr Leu Gln Cys Glu Thr
 195 200 205
 Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro Phe Leu Val His Ile
 210 215 220
 Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu Pro Arg Lys Ser Leu
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala
 245 250 255
 Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln
 260 265 270
 Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg Ser Gln Gln Thr His
 275 280 285
 Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn Val Ser Gln His Asp
 290 295 300
 Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg
 305 310 315 320
 Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro Phe Ile Ser Val Glu

X18726SequenceListingJUL2011ST25

325

330

335

Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
 340 345 350

Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
 355 360 365

Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His Ser Pro His Ala Leu
 370 375 380

Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly Thr Tyr Thr Leu Ala
 385 390 395 400

Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn Ile Ser Leu Glu Leu
 405 410 415

Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
 420 425 430

Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
 435 440 445

Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
 450 455 460

Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln
 465 470 475 480

Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala Val Thr Thr Gln Asp
 485 490 495

Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp Thr Glu Phe Val Glu
 500 505 510

Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asn Ala Asn Val
 515 520 525

Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
 530 535 540

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Thr Ile
 545 550 555 560

Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu
 565 570 575

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590
 Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605
 Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Leu
 610 615 620
 Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Ser Ile
 625 630 635 640
 Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655
 Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670
 Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
 675 680 685
 Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys Leu Val Ala Gly Ala
 690 695 700
 His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu
 705 710 715 720
 Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Lys Leu Ser Ile Gln
 725 730 735
 Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
 740 745 750
 Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
 755 760 765
 Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Val Gly Thr Gly Val
 770 775 780
 Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
 785 790 795 800
 Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
 805 810 815
 Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
 820 825 830

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
 835 840 845
 Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
 850 855 860
 Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
 865 870 875 880
 Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
 885 890 895
 Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
 900 905 910
 Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
 915 920 925
 Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Ala Lys Arg Asp
 930 935 940
 Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Gly Arg Phe
 945 950 955 960
 Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975
 Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys Thr Glu Gly Gly Ala
 980 985 990
 Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005
 Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
 1010 1015 1020
 Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
 1025 1030 1035
 Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val Lys Ile
 1040 1045 1050
 Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr
 1055 1060 1065
 Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro
 1070 1075 1080

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Glu	Ser	Ile	Phe	Asp	Lys	Val	Tyr	Thr	Thr	Gln	Ser	Asp	Val	Trp
1085						1090					1095			
Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser
1100						1105					1110			
Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Glu	Glu	Phe	Cys	Gln	Arg	Leu
1115						1120					1125			
Arg	Asp	Gly	Thr	Arg	Met	Arg	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala
1130						1135					1140			
Ile	Arg	Arg	Ile	Met	Leu	Asn	Cys	Trp	Ser	Gly	Asp	Pro	Lys	Ala
1145						1150					1155			
Arg	Pro	Ala	Phe	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Ile	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu
1160						1165					1170			
Gln	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Cys	Met	Ala	Pro
1175						1180					1185			
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Ser	Gln	Val	Ser
1190						1195					1200			
Thr	Met	Ala	Leu	His	Ile	Ala	Gln	Ala	Asp	Ala	Glu	Asp	Ser	Pro
1205						1210					1215			
Pro	Ser	Leu	Gln	Arg	His	Ser	Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Trp
1220						1225					1230			
Val	Ser	Phe	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Glu	Thr	Arg	Gly
1235						1240					1245			
Ser	Ser	Arg	Met	Lys	Thr	Phe	Glu	Glu	Phe	Pro	Met	Thr	Pro	Thr
1250						1255					1260			
Thr	Tyr	Lys	Gly	Ser	Val	Asp	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	Gly	Met	Val
1265						1270					1275			
Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Phe	Glu	Gln	Ile	Glu	Ser	Arg	His	Arg	Gln
1280						1285					1290			
Glu	Ser	Gly	Phe	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Gly	Gln	Asn	Val	Ala	Val
1295						1300					1305			
Thr	Arg	Ala	His	Pro	Asp	Ser	Gln	Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Glu

1310

Arg Gly Ala Arg Gly Gly Gln Val Phe Tyr Asn Ser Glu Tyr Gly
1325 1330 1335

Glu Leu Ser Glu Pro Ser Glu Glu Asp His Cys Ser Pro Ser Ala
1340 1345 1350

Arg Val Thr Phe Phe Thr Asp Asn Ser Tyr
1355 1360

<210> 18
<211> 1298
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18

Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
1 5 10 15

Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
20 25 30

Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
35 40 45

Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Ala Trp Pro Gly Ala
50 55 60

Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser Glu Asp Thr Gly Val
65 70 75 80

Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro Tyr Cys Lys Val Leu
85 90 95

Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Val Cys Tyr
100 105 110

Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Ser
115 120 125

Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe Ile Asn Lys Pro Asp
130 135 140

Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp Val Pro Cys Leu Val
145 150 155 160

Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser Gln Ser Ser Val Leu
Página 17

X18726SequenceListingJUL2011ST25

165

170

175

Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp Arg Arg Gly Met Leu
 180 185 190
 Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr Leu Gln Cys Glu Thr
 195 200 205
 Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro Phe Leu Val His Ile
 210 215 220
 Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu Pro Arg Lys Ser Leu
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala
 245 250 255
 Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln
 260 265 270
 Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg Ser Gln Gln Thr His
 275 280 285
 Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn Val Ser Gln His Asp
 290 295 300
 Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg
 305 310 315 320
 Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro Phe Ile Ser Val Glu
 325 330 335
 Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
 340 345 350
 Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
 355 360 365
 Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His Ser Pro His Ala Leu
 370 375 380
 Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly Thr Tyr Thr Leu Ala
 385 390 395 400
 Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn Ile Ser Leu Glu Leu
 405 410 415

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
 420 425 430
 Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
 435 440 445
 Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
 450 455 460
 Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln
 465 470 475 480
 Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala Val Thr Thr Gln Asp
 485 490 495
 Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp Thr Glu Phe Val Glu
 500 505 510
 Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asn Ala Asn Val
 515 520 525
 Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
 530 535 540
 Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Thr Ile
 545 550 555 560
 Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu
 565 570 575
 Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590
 Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605
 Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Leu
 610 615 620
 Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Ser Ile
 625 630 635 640
 Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655
 Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys Leu Val Ala Gly Ala
690 695 700

His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu
705 710 715 720

Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Lys Leu Ser Ile Gln
725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
755 760 765

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Val Gly Thr Gly Val
770 775 780

Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
785 790 795 800

Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
805 810 815

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
820 825 830

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
835 840 845

Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
850 855 860

Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
865 870 875 880

Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
885 890 895

Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
900 905 910

Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
915 920 925

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Ala Lys Arg Asp
930 935 940

Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Gly Arg Phe
945 950 955 960

Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
965 970 975

Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys Thr Glu Gly Gly Ala
980 985 990

Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
995 1000 1005

Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
1010 1015 1020

Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
1025 1030 1035

Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val Lys Ile
1040 1045 1050

Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr
1055 1060 1065

Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro
1070 1075 1080

Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp
1085 1090 1095

Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser
1100 1105 1110

Pro Tyr Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu
1115 1120 1125

Arg Asp Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala
1130 1135 1140

Ile Arg Arg Ile Met Leu Asn Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala
1145 1150 1155

Arg Pro Ala Phe Ser Glu Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu

1160

Gln Gly Arg Gly Leu Gln Glu Glu Glu Val Cys Met Ala Pro
1175 1180 1185

Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu Glu Gly Ser Phe Ser Gln Val Ser
1190 1195 1200

Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln Ala Asp Ala Glu Asp Ser Pro
1205 1210 1215

Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn Trp
1220 1225 1230

Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly Ala Glu Thr Arg Gly
1235 1240 1245

Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro Met Thr Pro Thr
1250 1255 1260

Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
1265 1270 1275

Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His Arg Gln
1280 1285 1290

Glu Ser Gly Phe Arg
1295

<210> 19
<211> 1363
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Met Gln Pro Gly Ala Ala Leu Asn Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
1 5 10 15

Leu Leu Gln Gly Leu Ala Asn Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
20 25 30

Asn Ile Thr Glu Asp Ser Tyr Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
35 40 45

Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Thr Trp Pro Gly Ala
50 55 60

Gln Glu Val Leu Thr Thr Gly Gly Lys Asp Ser Glu Asp Thr Arg Val
Página 22

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu
325 330 335

Trp Leu Lys Gly Pro Val Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
340 345 350

Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
355 360 365

Tyr Lys Asp Arg Lys Ala Val Thr Gly Arg His Asn Pro His Ala Leu
370 375 380

Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Ala Gly Val Tyr Thr Leu Ala
385 390 395 400

Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Gln Asn Ile Ser Leu Glu Leu
405 410 415

Val Val Asn Val Pro Pro His Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
420 425 430

Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Thr Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
435 440 445

Gly Val Pro Gln Pro Leu Ser Val Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
450 455 460

Pro Cys Lys Thr Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Arg
465 470 475 480

Asp Gly Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Lys Glu Val Thr Thr Gln Asp
485 490 495

Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Ser Trp Thr Glu Phe Val Glu
500 505 510

Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asp Ala Asn Val
515 520 525

Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Val Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
530 535 540

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Ser Ile
545 550 555 560

Glu Ser Glu Pro Ser Glu Asp Pro Leu Glu Gly Gln Ser Val Arg Leu
565 570 575

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Ser Cys Arg Ala Asp Asn Tyr Thr Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
580 585 590

Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala Gln Gly Asn Pro Leu Leu Leu
595 600 605

Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Glu Ala Asn Leu
610 615 620

Glu Glu Ala Glu Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Asn Ile
625 630 635 640

Pro Arg Val Ala Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Val Cys Glu Val Gln
645 650 655

Asp Arg Arg Ser Gln Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
660 665 670

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Arg Cys Pro Val Ala Gly Ala
690 695 700

His Val Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Lys
705 710 715 720

Glu Ser Gly Ile Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Arg Leu Ser Ile Gln
725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
755 760 765

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Val
770 775 780

Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
785 790 795 800

Lys Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
805 810 815

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
820 825 830

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
 835 840 845
 Arg Val Leu Gly His Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
 850 855 860
 Phe Gly Ile Asn Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
 865 870 875 880
 Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
 885 890 895
 Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
 900 905 910
 Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Asn Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
 915 920 925
 Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Val Lys Arg Asp
 930 935 940
 Thr Phe Asn Pro Tyr Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Arg Arg Phe
 945 950 955 960
 Arg Ala Met Val Glu Gly Ala Lys Ala Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975
 Ser Asp Arg Ala Leu Phe Thr Arg Phe Leu Met Gly Lys Gly Ser Ala
 980 985 990
 Arg Arg Ala Pro Leu Val Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005
 Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
 1010 1015 1020
 Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
 1025 1030 1035
 Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Ile Val Lys Ile
 1040 1045 1050
 Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr
 1055 1060 1065
 Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro

1070

Glu	Ser	Ile	Phe	Asp	Lys	Val	Tyr	Thr	Thr	Gln	Ser	Asp	Val	Trp
1085						1090					1095			
Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser
1100						1105					1110			
Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Glu	Glu	Phe	Cys	Gln	Arg	Leu
1115						1120					1125			
Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Met	Arg	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala
1130						1135					1140			
Ile	Arg	His	Ile	Met	Gln	Ser	Cys	Trp	Ser	Gly	Asp	Pro	Lys	Ala
1145						1150					1155			
Arg	Pro	Ala	Phe	Ser	Asp	Leu	Val	Glu	Ile	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu
1160						1165					1170			
Gln	Gly	Gly	Gly	Trp	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Met	Ala	Leu
1175						1180					1185			
His	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Met	Gln	Ala	Ser
1190						1195					1200			
Thr	Thr	Ala	Leu	His	Ile	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	Asp	Ser	Pro
1205						1210					1215			
Pro	Ser	Met	His	Cys	His	Ser	Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Cys
1220						1225					1230			
Val	Ser	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly
1235						1240					1245			
Ser	Ser	Arg	Met	Lys	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Pro	Met	Thr	Pro	Thr
1250						1255					1260			
Thr	Tyr	Lys	Ala	Ser	Met	Asp	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	Gly	Met	Val
1265						1270					1275			
Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Ser	Arg	His	Arg	Pro
1280						1285					1290			
Glu	Gly	Ser	Phe	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Gly	Gln	His	Met	Asp	Ile
1295						1300					1305			

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Pro Arg Gly His Pro Asp Pro Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro Thr
1310 1315 1320

Gln Gly Ala Gln Gly Gly Lys Val Phe Tyr Asn Asn Glu Tyr Gly
1325 1330 1335

Glu Val Ser Gln Pro Cys Thr Glu Gly Asp Cys Cys Pro Ser Ala
1340 1345 1350

Gly Ser Thr Phe Phe Ala Asp Ser Ser Tyr
1355 1360

<210> 20
<211> 1363
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

Met Gln Pro Gly Ala Ala Leu Asn Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
1 5 10 15

Leu Leu Gln Gly Leu Ala Asn Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
20 25 30

Asn Ile Thr Glu Asp Ser Tyr Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
35 40 45

Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Thr Trp Pro Gly Ala
50 55 60

Gln Glu Val Leu Thr Thr Gly Gly Lys Asp Ser Glu Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Val His Asp Cys Glu Gly Thr Glu Ala Arg Pro Tyr Cys Lys Val Leu
85 90 95

Leu Leu Ala Gln Thr His Ala Asn Asn Thr Gly Ser Tyr His Cys Tyr
100 105 110

Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Thr
115 120 125

Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Lys His Pro Phe Ile Asn Lys Pro Asp
130 135 140

Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ser Met Trp Val Pro Cys Leu Val
145 150 155 160

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Ser Ile Pro Gly Leu Asn Ile Thr Leu Arg Ser Gln Ser Ser Ala Leu
165 170 175

His Pro Asp Gly Gln Glu Val Leu Trp Asp Asp Arg Arg Gly Met Arg
180 185 190

Val Pro Thr Gln Leu Leu Arg Asp Ala Leu Tyr Leu Gln Cys Glu Thr
195 200 205

Thr Trp Gly Asp Gln Asn Phe Leu Ser Asn Pro Phe Val Val His Ile
210 215 220

Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Tyr Pro Lys Lys Ser Met
225 230 235 240

Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala
245 250 255

Glu Phe Asp Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln
260 265 270

Ala Glu Arg Ala Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg Ser Gln Gln Thr His
275 280 285

Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn Val Ser Gln Asn Asp
290 295 300

Leu Gly Pro Tyr Val Cys Glu Ala Asn Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg
305 310 315 320

Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu
325 330 335

Trp Leu Lys Gly Pro Val Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
340 345 350

Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
355 360 365

Tyr Lys Asp Arg Lys Ala Val Thr Gly Arg His Asn Pro His Ala Leu
370 375 380

Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Ala Gly Val Tyr Thr Leu Ala
385 390 395 400

Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Gln Asn Ile Ser Leu Glu Leu
405 410 415

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Val Val Asn Val Pro Pro His Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
 420 425 430

 Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Thr Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
 435 440 445

 Gly Val Pro Gln Pro Leu Ser Val Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
 450 455 460

 Pro Cys Lys Thr Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Arg
 465 470 475 480

 Asp Gly Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Lys Glu Val Thr Thr Gln Asp
 485 490 495

 Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Ser Trp Thr Glu Phe Val Glu
 500 505 510

 Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asp Ala Asn Val
 515 520 525

 Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Val Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
 530 535 540

 Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Ser Ile
 545 550 555 560

 Glu Ser Glu Pro Ser Glu Asp Pro Leu Glu Gly Gln Ser Val Arg Leu
 565 570 575

 Ser Cys Arg Ala Asp Asn Tyr Thr Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590

 Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala Gln Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605

 Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Glu Ala Asn Leu
 610 615 620

 Glu Glu Ala Glu Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Asn Ile
 625 630 635 640

 Pro Arg Val Ala Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655

 Asp Arg Arg Ser Gln Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Arg Cys Pro Val Ala Gly Ala
690 695 700

His Val Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Lys
705 710 715 720

Glu Ser Gly Ile Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Arg Leu Ser Ile Gln
725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
755 760 765

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Val
770 775 780

Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
785 790 795 800

Lys Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
805 810 815

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
820 825 830

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
835 840 845

Arg Val Leu Gly His Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
850 855 860

Phe Gly Ile Asn Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
865 870 875 880

Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
885 890 895

Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
900 905 910

Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Asn Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu

X18726SequenceListingJUL2011ST25

915

920

925

Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Val Lys Arg Asp
 930 935 940

Thr Phe Asn Pro Tyr Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Arg Arg Phe
 945 950 955 960

Arg Ala Met Val Glu Gly Ala Lys Ala Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975

Ser Asp Arg Ala Leu Phe Thr Arg Phe Leu Met Gly Lys Gly Ser Ala
 980 985 990

Arg Arg Ala Pro Leu Val Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005

Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
 1010 1015 1020

Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
 1025 1030 1035

Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Ile Val Lys Ile
 1040 1045 1050

Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr
 1055 1060 1065

Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro
 1070 1075 1080

Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp
 1085 1090 1095

Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser
 1100 1105 1110

Pro Tyr Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu
 1115 1120 1125

Lys Asp Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala
 1130 1135 1140

Ile Arg His Ile Met Gln Ser Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala
 1145 1150 1155

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Arg Pro Ala Phe Ser Asp Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu
1160 1165 1170

Gln Gly Gly Gly Trp Gln Glu Glu Glu Glu Arg Met Ala Leu
1175 1180 1185

His Ser Ser Gln Ser Ser Glu Glu Asp Gly Phe Met Gln Ala Ser
1190 1195 1200

Thr Thr Ala Leu His Ile Thr Glu Ala Asp Ala Asp Asp Ser Pro
1205 1210 1215

Pro Ser Met His Cys His Ser Leu Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn Cys
1220 1225 1230

Val Ser Phe Pro Gly Arg Leu Ala Arg Gly Thr Lys Thr Pro Gly
1235 1240 1245

Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Leu Pro Met Thr Pro Thr
1250 1255 1260

Thr Tyr Lys Ala Ser Met Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
1265 1270 1275

Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Glu Leu Glu Ser Arg His Arg Pro
1280 1285 1290

Glu Gly Ser Phe Ser Cys Lys Gly Pro Gly Gln His Met Asp Ile
1295 1300 1305

Pro Arg Gly His Pro Asp Pro Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro Thr
1310 1315 1320

Gln Gly Ala Gln Gly Gly Lys Val Phe Tyr Asn Asn Glu Tyr Gly
1325 1330 1335

Glu Val Ser Gln Pro Cys Thr Glu Gly Asp Cys Cys Pro Ser Ala
1340 1345 1350

Gly Ser Thr Phe Phe Ala Asp Ser Ser Tyr
1355 1360

<210> 21
<211> 1363
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Met Gln Pro Gly Ala Ala Leu Asn Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Gln Gly Leu Ala Asn Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
 20 25 30
 Asn Ile Thr Glu Asp Ser Tyr Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
 35 40 45
 Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Thr Trp Pro Gly Ala
 50 55 60
 Gln Glu Val Leu Thr Thr Gly Gly Lys Asp Ser Glu Asp Thr Arg Val
 65 70 75 80
 Val His Asp Cys Glu Gly Thr Glu Ala Arg Pro Tyr Cys Lys Val Leu
 85 90 95
 Leu Leu Ala Gln Thr His Ala Asn Asn Thr Gly Ser Tyr His Cys Tyr
 100 105 110
 Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Thr
 115 120 125
 Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Lys His Pro Phe Ile Asn Lys Pro Asp
 130 135 140
 Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ser Met Trp Val Pro Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Gly Leu Asn Ile Thr Leu Arg Ser Gln Ser Ser Val Leu
 165 170 175
 His Pro Asp Gly Gln Glu Val Leu Trp Asp Asp Arg Arg Gly Met Arg
 180 185 190
 Val Pro Thr Gln Leu Leu Arg Asp Ala Leu Tyr Leu Gln Cys Glu Thr
 195 200 205
 Thr Trp Gly Asp Gln Asn Phe Leu Ser Asn Leu Phe Val Val His Ile
 210 215 220
 Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Tyr Pro Lys Lys Ser Met
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala
 245 250 255

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Glu Phe Asp Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln
260 265 270

Ala Glu Arg Ala Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg Ser Gln Gln Thr His
275 280 285

Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn Val Ser Gln Asn Asp
290 295 300

Leu Gly Pro Tyr Val Cys Glu Ala Asn Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg
305 310 315 320

Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu
325 330 335

Trp Leu Lys Gly Pro Val Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
340 345 350

Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
355 360 365

Tyr Lys Asp Arg Lys Ala Val Thr Gly Arg His Asn Pro His Ala Leu
370 375 380

Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Ala Gly Val Tyr Thr Leu Ala
385 390 395 400

Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Gln Asn Ile Ser Leu Glu Leu
405 410 415

Val Val Asn Val Pro Pro His Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
420 425 430

Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Thr Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
435 440 445

Gly Val Pro Gln Pro Leu Ser Val Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
450 455 460

Pro Cys Lys Thr Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Arg
465 470 475 480

Asp Gly Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Lys Glu Val Thr Thr Gln Asp
485 490 495

Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Ser Trp Thr Glu Phe Val Glu
500 505 510

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asp Ala Asn Val
515 520 525

Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Val Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
530 535 540

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Ser Ile
545 550 555 560

Glu Ser Glu Pro Ser Glu Asp Pro Leu Glu Gly Gln Ser Val Arg Leu
565 570 575

Ser Cys Arg Ala Asp Asn Tyr Thr Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
580 585 590

Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala Gln Gly Asn Pro Leu Leu Leu
595 600 605

Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Glu Ala Asn Leu
610 615 620

Glu Glu Ala Glu Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Asn Ile
625 630 635 640

Pro Arg Val Ala Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Val Cys Glu Val Gln
645 650 655

Asp Arg Arg Ser Gln Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
660 665 670

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Arg Cys Pro Val Ala Gly Ala
690 695 700

His Val Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Lys
705 710 715 720

Glu Ser Gly Ile Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Arg Leu Ser Ile Gln
725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser

X18726SequenceListingJUL2011ST25

755

760

765

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Val
 770 775 780

Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
 785 790 795 800

Lys Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
 805 810 815

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
 820 825 830

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
 835 840 845

Arg Val Leu Gly His Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
 850 855 860

Phe Gly Ile Asn Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
 865 870 875 880

Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
 885 890 895

Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
 900 905 910

Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Asn Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
 915 920 925

Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Val Lys Arg Asp
 930 935 940

Thr Phe Asn Pro Tyr Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Arg Arg Phe
 945 950 955 960

Arg Ala Met Val Glu Gly Ala Lys Ala Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975

Ser Asp Arg Ala Leu Phe Thr Arg Phe Leu Met Gly Lys Gly Ser Ala
 980 985 990

Arg Arg Ala Pro Leu Val Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Leu Thr	Met Glu Asp Leu	Val Cys Tyr Ser Phe Gln	Val Ala Arg
1010		1015	1020
Gly Met	Glu Phe Leu Ala	Ser Arg Lys Cys Ile His	Arg Asp Leu
1025		1030	1035
Ala Ala	Arg Asn Ile Leu	Leu Ser Glu Ser Asp Ile	Val Lys Ile
1040		1045	1050
Cys Asp	Phe Gly Leu Ala	Arg Asp Ile Tyr Lys Asp	Pro Asp Tyr
1055		1060	1065
Val Arg	Lys Gly Ser Ala	Arg Leu Pro Leu Lys Trp	Met Ala Pro
1070		1075	1080
Glu Ser	Ile Phe Asp Lys	Val Tyr Thr Thr Gln Ser	Asp Val Trp
1085		1090	1095
Ser Phe	Gly Val Leu Leu	Trp Glu Ile Phe Ser Leu	Gly Ala Ser
1100		1105	1110
Pro Tyr	Pro Gly Val Gln	Ile Asn Glu Glu Phe Cys	Gln Arg Leu
1115		1120	1125
Lys Asp	Gly Thr Arg Met	Arg Ala Pro Glu Leu Ala	Thr Pro Ala
1130		1135	1140
Ile Arg	His Ile Met Gln	Ser Cys Trp Ser Gly Asp	Pro Lys Ala
1145		1150	1155
Arg Pro	Ala Phe Ser Asp	Leu Val Glu Ile Leu Gly	Asp Leu Leu
1160		1165	1170
Gln Gly	Gly Gly Trp Gln	Glu Glu Glu Glu Arg	Met Ala Leu
1175		1180	1185
His Ser	Ser Gln Ser Ser	Glu Glu Asp Gly Phe Met	Gln Ala Ser
1190		1195	1200
Thr Thr	Ala Leu His Ile	Thr Glu Ala Asp Ala Asp	Asp Ser Pro
1205		1210	1215
Pro Ser	Met His Cys His	Ser Leu Ala Ala Arg Tyr	Tyr Asn Cys
1220		1225	1230
Val Ser	Phe Pro Gly Arg	Leu Ala Arg Gly Thr Lys	Thr Pro Gly
1235		1240	1245

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Leu Pro Met Thr Pro Thr
1250 1255 1260

Thr Tyr Lys Ala Ser Met Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
1265 1270 1275

Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Glu Leu Glu Ser Arg His Arg Pro
1280 1285 1290

Glu Gly Ser Phe Ser Cys Lys Gly Pro Gly Gln His Met Asp Ile
1295 1300 1305

Pro Arg Gly His Pro Asp Pro Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro Thr
1310 1315 1320

Gln Gly Ala Gln Gly Gly Lys Val Phe Tyr Asn Asn Glu Tyr Gly
1325 1330 1335

Glu Val Ser Gln Pro Cys Thr Glu Gly Asp Cys Cys Pro Ser Ala
1340 1345 1350

Gly Ser Thr Phe Phe Ala Asp Ser Ser Tyr
1355 1360

<210> 22
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg
20 25 30

Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr
35 40 45

Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys
50 55 60

Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser
65 70 75 80

Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro
85 90 95

X18726SequenceListingJUL2011ST25

Val	Thr	Ile	Ser	Phe	Ala	Asn	His	Thr	Ser	Cys	Arg	Cys	Met	Ser	Lys
			100					105					110		

Leu

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X18726	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2011/050131	International filing date (<i>day/month/year</i>) 01/09/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 07/09/2010
Applicant IMCLONE LLC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/050131

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/050131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. PERSAUD: "Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C", JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 117, no. 13, 1 June 2004 (2004-06-01) , pages 2745-2756, XP55010516, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.01138 the whole document ----- -/--	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 2011

Date of mailing of the international search report

08/11/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aguilera, Miguel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/050131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	B. PYTOWSKI ET AL: "Complete and Specific Inhibition of Adult Lymphatic Regeneration by a Novel VEGFR-3 Neutralizing Antibody", JNCI JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, vol. 97, no. 1, 4 January 2005 (2005-01-04), pages 14-21, XP55010514, ISSN: 0027-8874, DOI: 10.1093/jnci/dji003 the whole document -----	1-15
A	WO 02/060950 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; LICENTIA LTD [FI]; ALITALO KARI [FI]; APR) 8 August 2002 (2002-08-08) examples 25-32 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/050131

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02060950	A2	08-08-2002	AT 359300 T 15-05-2007
		CA 2435503 A1 08-08-2002	
		CN 1494552 A 05-05-2004	
		DE 60219419 T2 16-08-2007	
		EP 1353952 A2 22-10-2003	
		JP 4669984 B2 13-04-2011	
		JP 2004532004 A 21-10-2004	
		JP 2010088433 A 22-04-2010	
		NO 20033285 A 19-09-2003	
		US 2006177901 A1 10-08-2006	
