

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

BT
Nov
261

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

07-56360

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL FACTOR DE
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

51. CLASIFICACIÓN IN

71. SOLICITANTE

ICE

ICA Y BIOTECNOLOGIA

DOMICILIO

CIUDAD DE LA HABANA, CUBA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

99/108/

1206/

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-056360- -00000-0000

Fecha: 2009-06-01 17:39:15 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **CENTRO DE INGENIERIA
GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Cuba.Dirección: Avenida 31 entre 158 y 190,
Cubanacán, Playa,
Ciudad De La Habana 10 600,
CubaDomicilio: Ciudad De La Habana,
Cuba**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Humberto LAMDAN ORDÁS**Calle 148, No. 24707,
entre 247 y 249, Bauta,
La Habana 32400,
Cuba3. **Marta AYALA AVILA**Calle 186, No. 3117, Apto 3D,
entre 31 y 33, Playa,
Ciudad De La Habana 11 600,
Cuba5. **Yanelys MORERA DÍAZ**Ave 39, No. 18202,
entre 182 y 184, Versalles,
La Lisa, Ciudad De La Habana 13545,
Cuba7. **Glay CHINEA SANTIAGO**Calle 186, No. 3115, Apto 4C,
entre 31 y 33, Playa,
Ciudad De La Habana 11 600,
Cuba2. **Jorge Víctor GAVILONDO COWLEY**Calle G, No. 460,
entre 19 y 21, Vedado, Plaza,
Ciudad De La Habana 10 400,
Cuba4. **Gertrudis ROJAS DORANTES**Santa Irene, No. 164 (altos),
entre flores y San Benigno,
Santos Suárez,
Ciudad De La Habana 10500,
Cuba6. **Osmany GUIROLA CRUZ**Soledad, No. 205, Apto 800-A,
entre Animas y San Lorenzo,
Centro Habana,
Ciudad De La Habana 10300,
Cuba8. **Nelson Francisco SANTIAGO VISPO**Calle 186, No. 3115,
Entre 31 y 33, Cubanacán
Playa, Ciudad De La Habana 11 600,
Cuba

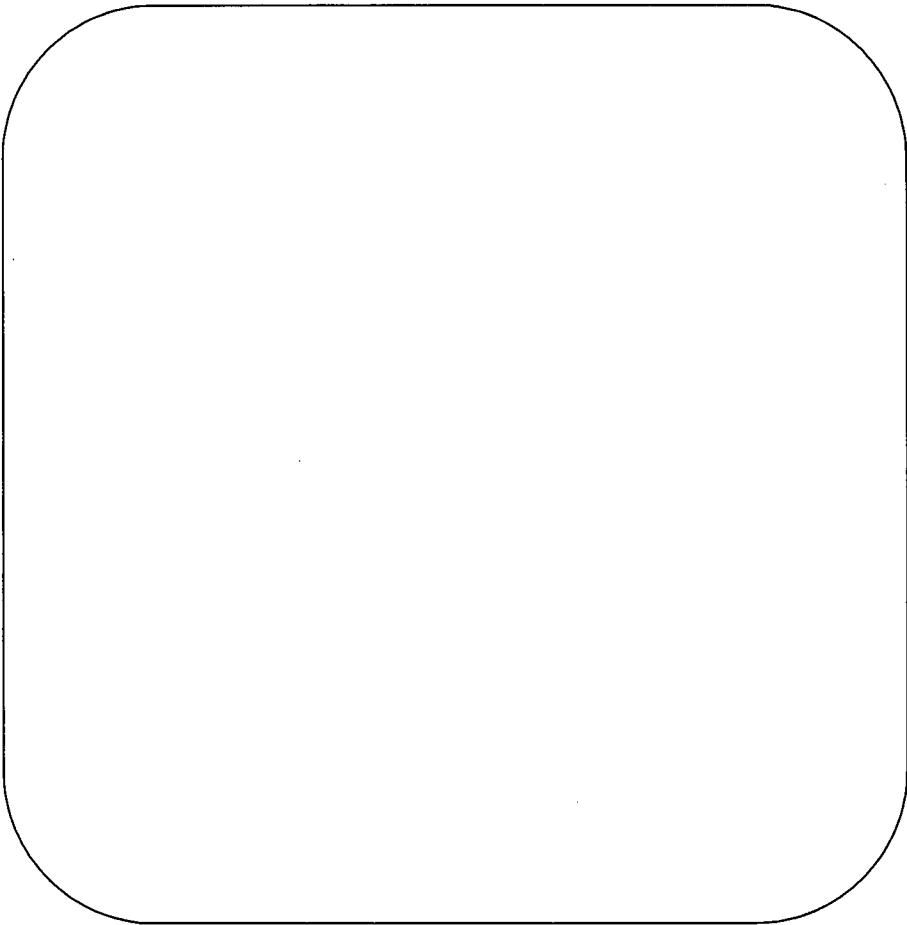
5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/CU2007/000019Publicación Internacional No. WO 2008/052489Fecha: 30 de octubre de 2007Fecha: 8 de mayo de 2008

6	Título (54) ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K 016/022</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>CU</u>	(32) Fecha <u>01 de noviembre de 2006</u>
			(31) Número de Solicitud <u>2006-0208</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>09-36,601</u> Comprobante de pago No.: <u>09-38,533</u> Comprobante de pago No.: <u>09-38,534</u>		Fecha: <u>18 de mayo de 2009</u> Fecha: <u>26 de mayo de 2009</u> Fecha: <u>26 de mayo de 2009</u>
10	Anexos:		
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.		
☒	Comprobante de pago por dos (2) reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$50.000.oo.		
☒	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.		
☒	Poderes, si fuere el caso.		
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
☐	Declaraciones.		
☒	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)		
☐	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)		
☒	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.		
☒	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.		
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.		
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.		
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.		
☐	Arte final 12x12		
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.		
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS		

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/052489 A1

Descripción:

Páginas 55 en el idioma original español

Reivindicaciones: Número (s) 17

Figuras: Número (s) 15

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias

4. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.

5. ☒ Extracto de publicación.

RATIFICACION, REPRESENTACION Y PODER

8972

5917

La que suscribe, CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,

sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Cuba,

domiciliada en 31 Street 1/150 & 190, Cubanacan, Playa, Habana, Cuba,

por el presente ratificamos la solicitud de patente No. 97.057.986

presentada por EMILIO FERRERO el 3 de octubre de 1997

ante la Superintendencia de Industria y Comercio en Bogotá, Colombia,

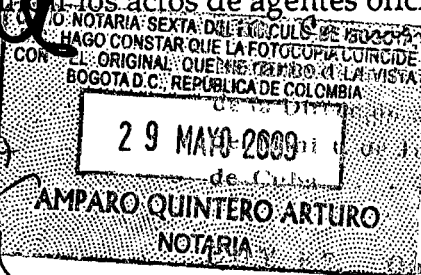
y nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de nuestra propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, renuncia voluntaria, y registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Firmado en la ciudad de La Habana

el 19 de noviembre de 1997

Dr. Manuel de Jesús Limonta Vidal



La Habana, a los 19 días del mes
de noviembre de 1997

Para los países que no son parte del Protocolo Interamericano de 1940 sobre Uniformidad del Régimen Legal de los Poderes, el Cónsul Colombiano debe certificar como sigue*:

Fecha:

Nº _____

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

CERTIFICA:

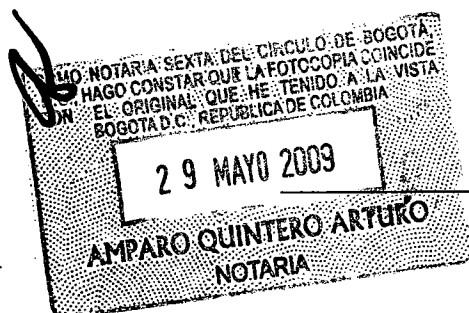
1º Que el señor
quien autentica el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones de

y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

2º Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
que actualmente ejerce su objeto social y;

existe legalmente, y

3º Que el señor
quien firmó la representación y poder que preceden en su carácter de
de la Compañía
está autorizado para representarla en este acto, y otorgar el poder.



Cónsul de Colombia

* Son parte del Protocolo: Colombia, El Salvador, México, Venezuela y los Estados Unidos. En los demás países el Señor Cónsul de Colombia debe otorgar el certificado según el modelo de esta página.

FECHA

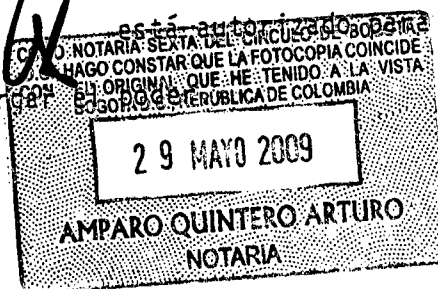
No.

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

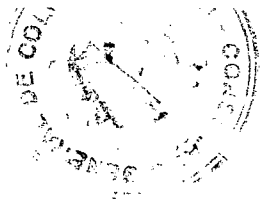
C E R T I F I C A :

- 1o. Que el señor
quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente
en la fecha allí indicada, las funciones de
y que la firma
y sello que en el documento aparecen como suyos son los que
usa y acostumbra en sus actos oficiales.
- 2o.) Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,
domiciliada en 31 Street 1/156 & 190, Cubanacan, Playa,
Habana, Cuba,
existe legalmente y que actualmente ejerce su objeto social
de acuerdo con las leyes del respectivo país.
- 3o.) Que el señor , quien
firmó el poder que precede en su carácter de
representarla en este acto y otorgar

DERECHOS USS



CONSUL



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION JURIDICA

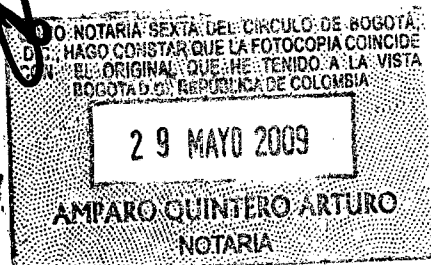
José D. Peraza Chapeau, /o Julio P. Alvarez Dorta
/o Orlando F. Acosta Faz, /o María Silvia Fernández Villar,
/o Aida de Puzo Pedraza, /o Manuel Capaz Ruiz, /o Jesús Fernández Ponce. Funcionarios autorizados para certificar Autenticaciones de firma en Documentos expedidos para surtir efectos en el extranjero.

CERTIFICO: QUE AL PARECER ES AUTENTICA DEL FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO, LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR LA SEMEJANZA QUE GUARDA CON LA QUE OTRA REGISTRADA EN ESTE CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA

26 NOV 1997





Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 67/97

La Habana, Diciembre 26 de 1997

La suscrita Cónsul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que el Señor Jesús Fernández Ponce, quien como funcionario de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; Que el CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA es una unidad presupuestada constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; Que el Señor Manuel de Jesús Limonta Vidal, quien en su carácter de Director de la citada unidad presupuestada confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Consul General de Colombia no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

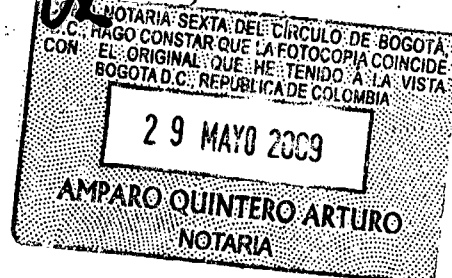
Martha Niño de Stand

Martha Niño de Stand.
Consul General

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

US\$ 6,00 (seis dólares)
US\$ 100.00 (cien dólares)
US\$ 106.00 (ciento seis dólares)



CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX: (57) (1) 2358850
CABLES CAVELEYES
TELEX: 45479

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª, No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO: (57) (1) 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

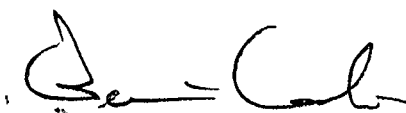
Poderdante: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Poder conferido el: 19-11-97

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,


GERMAN CAVELIER
T.P.A. No. 832

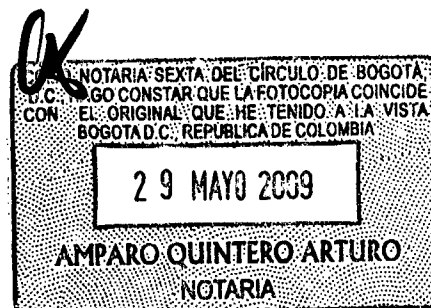
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:


EMILIO FERRERO

T.P.A. No 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Santa Fe de Bogotá D. C.

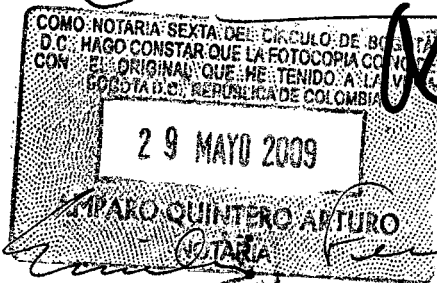
Abogado **JUAN MANUEL BOTERO MEDINA**
NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA

13 ENE. 1998

Yo, [Firma] [Firma]
[Firma] [Firma]
[Firma] [Firma]
exhibí(eron) personalmente

el(los) exhibí(eron) la(s) [Firma]
[Firma]
y la(s) Libreta(s) Militar(es) [Firma]
[Firma] [Firma] [Firma]

en Bogotá, y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que
el contenido del mismo es cierto
En constancia se firma esta diligencia..



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de Mayo de 2008 (08.05.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/052489 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/22 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2007/000019

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de Octubre de 2007 (30.10.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2006-0208

1 de Noviembre de 2006 (01.11.2006) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y
190, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 10 600
(CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LAMDAN
ORDÁS, Humberto [CU/CU]; Calle 148, No. 24707,
entre 247 y 249,, Bauta, La Habana 32400 (CU). GAV-
ILONDO COWLEY, Jorge, Víctor [CU/CU]; Calle G,
No. 460, entre 19 y 21, Apto. 11, VedadoPlaza, Ciudad
De La Habana 10 400 (CU). AYALA AVILA, Marta
[CU/CU]; Calle 186, No. 3117, Apto 3D, entre 31 y
33, Playa, Ciudad De La Habana 11 600 (CU). ROJAS
DORANTES, Gertrudis [CU/CU]; Santa Irene, No.

164 (altos), entre Flores y San Benigno, Santos Suárez,
Ciudad De La Habana 10500 (CU). MORERA DÍAZ,
Yanelys [CU/CU]; Ave 39, No.18202, entre 182 y 184,
Versalles,, La Lisa, Ciudad De La Habana 13545 (CU).
GUIROLA CRUZ, Osmany [CU/CU]; Soledad, No.
205, Apto 800-A, entre Animas y San Lorenzo, Centro
Habana, Ciudad De La Habana 10300 (CU). CHINEA
SANTIAGO, Glay [CU/CU]; Calle 186, No. 3115, Apto
4C, entre 31 y 33, PlayaCiudad De La Habana 11 600
(CU). SANTIAGO VISPO, Nelson, Francisco [CU/CU];
Calle 186, No 3115, entre 31 y 33, Cubanacán,, Playa,
Ciudad De La Habana 11 600 (CU).

(74) Mandatario: GONZÁLEZ BLANCO, Sonia; Avenida
31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Ha-
bana 10 600 (CU).

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

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: RECOMBINANT ANTIBODIES AGAINST VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

(54) Título: ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCU-
LAR (VEGF)

(57) Abstract: The invention relates to recombinant antibody-related polypeptide molecules which specifically recognise human
vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and interfere with the *in vivo* proangiogenic and *in vitro* stimulatory effects thereof.
The aforementioned recombinant polypeptide molecules can affect the proliferation of *in vitro* human endothelial cells, subcuta-
neous angiogenesis in mice, induced by matrigel plugs containing VEGF-A, and the growth of human tumours transplanted to nude
mice. Some of these molecules prevent choroid neovascularisation in a non-human primate experimental model. Said molecules can
be used for passive immunotherapy of pathological entities having a course that is associated with an increase in vasculature, such
as age-related macular degeneration (moist type), cancer and the metastasis thereof, neovascular glaucomas, diabetic and neonatal
retinopathy, acute and chronic inflammatory processes, infectious diseases, autoimmune diseases, organ transplant rejection, heman-
giomas and angiofibromas among others.

(57) Resumen: Moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas con anticuerpos, que reconocen específicamente el Factor de
Crecimiento de Endotelio Vascular-A (VEGF-A) humano, e interfieren con sus efectos estimulatorios *in vitro*, y pro-angiogénicos
in vivo. Dichas moléculas polipeptídicas recombinantes son capaces de afectar la proliferación de células endoteliales humanas *in*
vitro, la angiogénesis subcutánea en ratones inducida por tapones de Matrigel que contienen VEGF-A, y el crecimiento de tumores
humanos transplantados a ratones desnudos. Varias de estas moléculas previenen la neovascularización coroidea en un modelo ex-
perimental en primates no humanos. Estas moléculas pueden emplearse para la inmunoterapia pasiva de entidades patológicas cuyo
curso se asocia al aumento de la vasculatura, tales como la degeneración macular asociada a la edad (variante húmeda), el cáncer y sus
metástasis, los glaucomas neovasculares, la retinopatía diabética y del recién nacido, los procesos inflamatorios agudos y crónicos,
enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, el rechazo al trasplante de órganos, los hemangiomas y los angiofibromas,
entre otros

WO 2008/052489 A1

WO 2008/052489 A1



(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF).

Campo de la técnica

- 5 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología y la industria farmacéutica, en particular con el desarrollo y aplicación de moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas con anticuerpos, que reconocen específicamente el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular-A (en inglés "Vascular Endothelial Growth Factor-A", abreviado VEGF-A) humano (Ferrara, N. *et*
- 10 *al.* 2003. *Nature Medicine* 9: 669-676) e interfieren con sus efectos estimulatorios *in vitro* y pro-angiogénicos *in vivo*. Entre estas moléculas se encuentran un fragmento de anticuerpo tipo Fv de cadena simple (en inglés "single-chain variable fragment", abreviado scFv), un fragmento de anticuerpo tipo Fab, y moléculas recombinantes bivalentes tipo "anticuerpo completo" (scFv₂-Fc).

15

Estado de la técnica anterior

- El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de aquellos pre-existentes se denomina angiogénesis, que está regulado por un equilibrio de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Entre las enfermedades cuyo curso
- 20 se ha relacionado con la inducción de factores pro-angiogénicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos de forma anómala están: el cáncer (tanto los tumores primarios como sus metástasis), procesos inflamatorios agudos y crónicos como el asma, el distrés respiratorio, la endometriosis, la aterosclerosis, los edemas tisulares, enfermedades de origen infeccioso como las hepatitis y el sarcoma de
- 25 Kaposi, enfermedades autoinmunes como la diabetes, la psoriasis, la artritis reumatoide, la tiroiditis, y otras varias enfermedades y estados tales como la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al trasplante de órganos, la degeneración macular asociada a la edad (variante húmeda), los glaucomas neovasculares, los hemangiomas y los angiofibromas (Carmeliet, P. y Jain, RK.
- 30 2000. *Nature* 407: 249-257; Kuwano M, *et al.* 2001. *Intern Med* 40: 565-572).

Un procedimiento terapéutico atractivo para muchas de estas enfermedades puede basarse en la inhibición de la actividad de los factores pro-angiogénicos que estimulan la formación anómala de vasos, mediante la administración de moléculas

que los neutralicen. En la práctica médica, el anticuerpo recombinante humanizado Bevacizumab, conocido comercialmente con el nombre de Avastin (Ferrara, N. *et al.* 2005. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 328-335), que reconoce y neutraliza el efecto pro-angiogénico del VEGF-A humano, ha sido aprobado en varios países para el tratamiento de procesos tumorales. Se ha demostrado que su efecto depende mayoritariamente de la inhibición de la neo-angiogénesis que induce el VEGF-A producido por las células tumorales y otras del estroma tumoral, tales como macrófagos y fibroblastos. Este anticuerpo fue originalmente obtenido como un anticuerpo monoclonal murino (Kim, KJ. *et al.* 1992. *Growth Factors* 7: 53-64) mediante la inmunización de ratones con la isoforma 165 del VEGF-A humano obtenida en mamíferos. El anticuerpo fue luego modificado por ingeniería genética para lograr su humanización, lo que le confiere una mejor tolerancia y eficacia terapéutica al ser aplicado en humanos.

Recientemente, se ha aprobado en varios países el uso del Ranibizumab (Gaudreault, J. *et al.* 2005. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 46: 726-733), conocido comercialmente con el nombre de Lucentis, un fragmento de anticuerpo derivado del ya mencionado Avastin, para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, variante húmeda. El Ranibizumab es un fragmento recombinante de anticuerpo tipo Fab, originado por manipulación del Bevacizumab por ingeniería genética. La inyección intravítrea del Ranibizumab neutraliza el VEGF-A producido localmente y afecta la neo-angiogénesis en la retina profunda, que es base de esta enfermedad.

Los factores de crecimiento del endotelio vascular son una familia de moléculas que inducen de manera directa y específica la formación de nuevos vasos (Leung, D. *et al.* 1989. *Science* 246:1306-1309). Esta familia comprende al factor de permeabilidad vascular, también conocido como factor de crecimiento del endotelio vascular (en inglés "Vascular Permeability Factor", abreviado VPF) (ahora denominado VEGF-A), el factor de crecimiento de placenta (en inglés "Placental Growth Factor", abreviado PIGF), los factores de crecimiento derivados de plaquetas (en inglés "Platelet-Derived Growth Factor", abreviado PDGF) PDGF-A y PDGF-B, y otras moléculas relacionadas estructural y funcionalmente con el VEGF-A, que se han denominado VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E (Olofsson, B. *et al.* 1996. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2576-2581; Joukov, V. *et al.* 1996. *EMBO J* 15:290-298;

Yamada, Y. *et al.* 1997. Genomics 42:483-488; Ogawa, S. *et al.* 1998. J Biol Chem 273:31273-31282).

El VEGF-A es una glicoproteína homodimérica formada por dos subunidades de 23 kDa (Ferrara, N. *et al.* 1989. Biochem Biophys Res Commun 161: 851-858) de la cual existen 5 isoformas monoméricas derivadas del corte y empalme diferencial de un mismo ácido ribonucleico (ARN). Estas incluyen dos isoformas que se mantienen unidas a la membrana celular (VEGF 189 y VEGF 206) y tres de naturaleza soluble (VEGF 121, VEGF 145, y VEGF 165). La isoforma VEGF 165 es la más abundante en tejidos de mamíferos, excepto en pulmón y corazón, donde predomina el VEGF 189 (Neufeld G *et al.* 1995. Canc Met Rev 15:153-158), y en placenta, donde prevalece la expresión del VEGF 121 (Shibuya, M. 1995. Adv Cancer Res 67: 281-316).

El VEGF-A es la proteína más estudiada y caracterizada de esta familia, y su alteración se ha descrito en un número mayor de enfermedades. Su sobre-expresión se asocia con tumores de diferente origen y localización y sus metástasis (Grunstein, J. *et al.* 1999. Cancer Res 59: 1592-1598), procesos inflamatorios crónicos como la colitis ulcerativa y enfermedad de Chron (Kanazawa, S. *et al.* 2001. Am J Gastroenterol 96: 822-828), psoriasis (Detmar, M. *et al.* 1994. J Exp Med 180: 1141-1146), distrés respiratorio (Thickett, DR. *et al.* 2001. Am J Respir Crit Care Med 164: 1601-1605), aterosclerosis (Celletti, FL. *et al.* 2001. Nat Med 7: 425-429), endometriosis (McLaren, J. 2000. Hum Reprod Update 6: 45-55), asma (Hoshino, M. *et al.* 2001. J Allergy Clin Immunol 107: 295-301), artritis reumatoide y osteoartritis (Pufe, T. *et al.* 2001. J Rheumatol 28: 1482-1485), tiroiditis (Nagura, S. *et al.* 2001. Hum Pathol 32: 10-17), retinopatía diabética y del recién nacido (Murata, T. *et al.* 1996. Lab Invest 74: 819-825; Reynolds, JD. 2001. Paediatr Drugs 3: 263-272), degeneración macular y glaucomas (Wells, JA. *et al.* 1996. Br J Ophthalmol 80: 363-366), edemas tisulares (Kaner, RJ. *et al.* 2000. Am J Respir Cell Mol Biol 22: 640-641), obesidad (Tonello, C. *et al.* 1999. FEBS Lett 442: 167-172), hemangiomas (Wizigmann, S. y Plate, KH. 1996. Histol Histopathol 11: 1049-1061), en el líquido sinovial de pacientes con artropatías inflamatorias (Bottomley, MJ. *et al.* 2000. Clin Exp Immunol 119:182-188) y asociada al rechazo al trasplante (Vasir, B. *et al.* 2001. Transplantation 71: 924-935). En el caso particular de los tumores, las células

que expresan las tres isoformas básicas del VEGF-A (121, 165 y 189), son las que crecen con mayor rapidez *in vivo* (Grunstein, J. 2000. Mol Cell Biol 20: 7282-7291).

Las alteraciones de la función de las células endoteliales inducidas por las moléculas de la familia del VEGF están mediadas por la unión de estas a receptores celulares tirosina quinasa clase III, que hasta ahora incluyen el VEGFR1 (Flt1), el VEGFR2 (KDR/Flk1) y el VEGFR3 (Flt4) (Kaipainen, A. 1993. J Exp Med 178: 2077-2088). Se ha identificado el dominio 2 del extremo N-terminal como el responsable de la unión a los ligandos, propiciándose la fosforilación del dominio citoplasmático y la transducción de la señal (Davis-Smyth, T. *et al.* 1996. EMBO 15: 4919-4927).

- 10 El receptor VEGFR2 (KDR/Flk1) media los efectos biológicos del VEGF-A, y también se une a los ligandos VEGF-C y VEGF-D. Este receptor se expresa de manera diferencial en el endotelio activo y en algunas líneas celulares de origen tumoral donde establece lazos autocrinos con el VEGF secretado. Además de estar involucrado en las patologías ya descritas, que se relacionan con la sobre-expresión de sus ligandos, su sobre-expresión en particular se ha relacionado con el avance:
- 15 del cáncer de endometrio (Giatromanolaki, A. *et al.* 2001. Cancer 92: 2569-2577), de mesoteliomas malignos (Strizzi, L. *et al.* 2001. J Pathol 193: 468-475), de neoplasmas astrocíticos (Carroll, RS. *et al.* 1999. Cancer 86: 1335-1341), de cáncer primario de mama (Kranz, A. *et al.* 1999. Int J Cancer 84: 293-298), de cáncer gástrico tipo intestinal (Takahashi, Y. *et al.* 1996. Clin Cancer Res 2: 1679-1684), de glioblastoma multiforme, oligodendrogliomas anaplasticos, y ependimomas con necrosis (Chan, AS. *et al.* 1998. Am J Surg Pathol 22: 816-826). La sobre-expresión del KDR se ha asociado, además, a la enfermedad autonómica VHL y a hemangioblastomas (Wizigmann-Voos, S. *et al.* 1995. Cancer Res 55:1358-1364), al avance de la retinopatía diabética (Ishibashi, T. 2000. Jpn J Ophthalmol 44:323-324) y, junto al Flt-1, a las reacciones de hipersensibilidad retardada (Brown, LF. *et al.* 1995. J Immunol 154:2801-2807)

- La mayor parte de las nuevas estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la angiogénesis, especialmente para cáncer, se basan en el bloqueo del VEGF-A y/o sus receptores, resaltándose entre los productos aprobados o en ensayo clínico los siguientes: (1) anticuerpos monoclonales bloqueadores del VEGF-A o del receptor KDR, (2) inhibidores de las metaloproteinasas, como el Neovastat y el Prinomastat, (3) inhibidores del VEGF como la Talidomida, el Suramin, la Troponina I, el IFN- α y
- 30

el Neovastat, (4) bloqueadores de receptores del VEGF como los SU5416, FTK787 y SU6668), (5) inductores de apoptosis del endotelio tumoral como la Endostatina y el CA4-P, y (6) ribozimas que disminuyen la expresión del VEGF o de sus receptores (Angiozyme).

- 5 De todos los anteriores, son los anticuerpos (y sus fragmentos) neutralizantes de los efectos pro-angiogénicos del VEGF-A los que más han avanzado en cuanto a su aplicación y aceptación como productos terapéuticos. Además de los ejemplos del Bevacizumab y el Ranibizumab que mencionamos más arriba, y que ya han sido registrados, existen reportes de otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que
- 10 reconocen y neutralizan el VEGF humano (Muller, Y. *et al.* 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94: 7192-7197; Asano, M. *et al.* 1998. Hybridoma 17:185-190; Vitaliti A. *et al.* 2000. Cancer Res 60: 4311-4314; Brekken, RA. y Thorpe, PE. 2001. J Controlled Release 74:173-181; Jayson, G. *et al.* 2002. JNCI 94: 1484-1493; Brekken, RA. *et al.* 2000. Cancer Res 60: 5117-5124; Fuh, G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-
- 15 6631; US 5730977).

Explicación de la invención

La presente invención describe moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas con anticuerpos que comprenden regiones variables (RV) de

20 inmunoglobulinas humanas codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas; que reconocen un epítipo en el VEGF-A humano definido alrededor de, aunque no necesariamente limitado a, los residuos C102, C57, R56, T31 y L32; e interfieren con su efecto pro-angiogénico. Se demuestra la capacidad de dichas moléculas para neutralizar los efectos pro-

25 angiogénicos del VEGF-A humano en modelos *in vitro* e *in vivo* relevantes a la neo-angiogénesis. Estas moléculas están formadas por uno o más sitios de unión al antígeno, constituidos estos sitios a partir de aminoácidos codificados por secuencias de ADN de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas.

30 A los efectos de esta invención se define la siguiente terminología:

- Anticuerpos recombinantes

Describe una inmunoglobulina o partes de esta producidas parcial o totalmente de forma sintética (por la vía del ácido dextrirribonucleico (ADN) recombinante o de síntesis artificial de genes) con reconocimiento específico de un antígeno mediante uno o más dominios que interactúan con este (formados por combinaciones particulares de regiones variables de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas, y que se denomina comúnmente sitio de unión al antígeno) (Gavilondo y Larrick. 2000. Biotechniques 29: 128-136.). Ejemplos de anticuerpos recombinantes son los llamados anticuerpos quiméricos y humanizados, en los cuales se asocian por ingeniería genética las regiones variables (o partes de estas) obtenidas de una especie, con regiones constantes de inmunoglobulinas de otra especie. Entre los anticuerpos recombinantes también están los fragmentos de anticuerpos producidos por ingeniería genética que comprenden uno o más sitios de unión al antígeno. Ejemplos de fragmentos recombinantes de anticuerpos son: (i) el fragmento Fab que incluye los dominios VL, VH, CL y CH1 de una inmunoglobulina; (ii) el fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento scFv, donde los dominios VH y VL de un único anticuerpo se unen en diferente secuencia (VH-VL o VL-VH) con un segmento de unión peptídico (*linker*) que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión al antígeno (Bird *et al.* 1988. Science 242: 423-426; Huston *et al.* 1988. PNAS USA 85: 5879-5883); (v) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos de forma similar al scFv, pero donde el pequeño tamaño del *linker* no permite a los dominios VH y VL de una misma molécula scFv asociarse entre sí, y los sitios de unión al antígeno se forman mediante la asociación de dos o más scFv (WO94/13804; Holliger P *et al.* 1993. PNAS USA 90: 6444-6448); (vi) otros fragmentos como el dAb (Ward SE *et al.* 1989. Nature 341: 544-546), regiones determinantes de la complementaridad (en inglés "Complementarity Determinant Region", abreviado CDR) aisladas, fragmentos F(ab')₂ y dímeros biespecíficos de scFv (PCT/US92/09965; Holliger P y Winter G. 1993. Current Opinion Biotechnol. 4: 446-449; de Haard, H *et al.* 1998. Adv. Drug Delivery Rev. 31:5-31). Algunos tipos de fragmentos, como los scFv y los Fab, se pueden obtener asimismo a partir de bibliotecas de anticuerpos, donde un repertorio amplio de genes (ya sea sintéticos o naturales) de las regiones variables de una especie se combinan al azar para producir

asociaciones particulares de regiones variables de anticuerpos, que se exponen luego en la superficie de fagos filamentosos.

Son también anticuerpos recombinantes las moléculas "tipo anticuerpo" producidas por ingeniería genética cuando se ensamblan artificialmente fragmentos de anticuerpo a regiones constantes de anticuerpos. Por ejemplo, es posible construir una molécula "tipo anticuerpo" bivalente uniendo un scFv a una región formada por los dominios bisagra, CH2, CH3 y en ocasiones CH4 del Fc de una inmunoglobulina, que en dependencia de poseer todas o parte de las regiones descritas y de su grado de glicosilación, puede exhibir funciones efectoras asociadas al Fc de las inmunoglobulinas.

• Sitio de unión al antígeno. Epítope

El primer término describe la parte de un anticuerpo que interactúa específicamente con un antígeno (o parte de él). Cuando el antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epítope. Un sitio de unión de un anticuerpo está formado principalmente por dos regiones variables de anticuerpo, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada. El sitio de unión de anticuerpo se forma por la interacción no covalente de las regiones variables. El sitio de unión de un anticuerpo puede ser estabilizado de forma artificial mediante la unión de las dos regiones variables con un péptido de unión (linker) que no interfiera con sus propiedades de reconocimiento específico del antígeno. Este es el caso de un fragmento tipo scFv. De forma natural, los sitios de unión de anticuerpo se ensamblan mediante la interacción no covalente de las regiones variables, que se refuerza mediante la interacción no covalente de los dominios CH1 y CL (kappa o lambda) que siguen en la estructura de la molécula nativa a las regiones variables de cadena pesada y ligera, respectivamente. Los anticuerpos completos nativos poseen dos sitios de unión al antígeno idénticos. El epítope reconocido por el sitio de unión de un anticuerpo, en el caso de ser el antígeno una proteína, puede estar formado por una secuencia lineal de aminoácidos, o ser conformacional, entendiéndose por ello que los aminoácidos reconocidos por el sitio de unión del anticuerpo están cercanos en la estructura terciaria de la proteína, pero no son necesariamente secuenciales en su estructura primaria. En el caso de proteínas, el epítope es por naturaleza una

zona discreta, definida por un grupo particular de aminoácidos que interactúan con los del anticuerpo mediante enlaces no covalentes.

- Anticuerpo homólogo

Se trata de un anticuerpo natural o producido por ingeniería genética que
5 reconoce de forma específica un epítipo de un antígeno, que es también
identificado de forma específica por otro anticuerpo diferente. Los dos anticuerpos
en cuestión pueden estar relacionados en las secuencias de sus regiones
variables (por ejemplo, uno se deriva de otro gracias a mutaciones que pueden
10 ser más o menos extensas), o pueden tener secuencias de regiones variables
totalmente diferentes. Esto último se debe a que las interacciones específicas
entre anticuerpos y antígenos, especialmente en el caso de las proteínas, se
produce mediante interacciones de superficie, es decir, la formación de enlaces no
covalentes (enlaces de hidrógeno, de van der Waals y similares) entre residuos
15 aminoacídicos de las regiones variables (aunque pueden participar de forma
discreta algunos residuos cercanos estructuralmente a estas). Ello hace que dos
anticuerpos diferentes cuyos sitios de unión sean diferentes en cuanto a
secuencia, pueden aún así presentar una suficiente identidad de interacción con
el epítipo particular, que los haga específicos para este. Un anticuerpo homólogo
debe ser capaz por tanto de identificar de forma específica el epítipo particular
20 reconocido por otro anticuerpo. El término homólogo es extensible a otras formas
de anticuerpos comprendidas en las definiciones que aparecen arriba para
anticuerpos recombinantes (fragmentos de anticuerpos, moléculas "tipo
anticuerpo", y otras).

- Específico

25 Se refiere a la situación en la cual un anticuerpo o fragmento de este no presenta
una unión significativa a otras moléculas diferentes de su pareja de unión
específica. Este término es también aplicable al caso donde un sitio de unión al
antígeno es específico para un epítipo particular que aparece en un número de
antígenos relacionados o no, en cuyo caso el sitio de unión será capaz de unirse a
30 varios antígenos que porten el mencionado epítipo.

En una realización de la invención, las molécula polipeptídicas recombinantes
relacionadas con anticuerpos son: un fragmento de anticuerpo tipo Fv de cadena
simple (scFv) humano (scFv 2H1), un fragmento de anticuerpo Fab (Fab 2H1-32) y

moléculas bivalentes tipo "anticuerpo completo" scFv₂-Fc (scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2). En todas ellas las RV diferentes se ensamblan espontáneamente entre sí para formar sitios de unión al antígeno. En la estabilidad de este ensamblaje pueden contribuir segmentos de unión artificiales (*linkers*) u otras secuencias relacionadas con anticuerpos, como son dominios constantes de las inmunoglobulinas. Las RV se derivan de las contenidas en un scFv que se aisló de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos scFv humanos desplegados en la superficie de fagos filamentosos, construida empleando exclusivamente un repertorio de RV de cadenas lambda humanas.

Gracias a la estrategia empleada, las moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas con anticuerpos descritas en esta invención tienen RV de inmunoglobulinas con secuencias de ADN novedosas y diferentes a las reportadas por otros autores que también han obtenido anticuerpos que neutralizan la acción pro-angiogénica del VEGF-A, como aquellos derivados de hibridomas (Kim, KJ. *et al.* 1992. Growth Factors 7:53-64; Muller, Y. *et al.* 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94: 7192-7197; Asano, M. *et al.* 1998. Hybridoma 17:185-190; Schaeppi, JM. *et al.* 1999. J Cancer Res Clin Oncol 125: 336-342; Brekken, RA. *et al.* 2000. Cancer Res 60: 5117-5124; Brekken, RA. y Thorpe, PE. 2001. J Controlled Release 74:173-181), a partir de la transformación de células humanas por virus (US 5730977), por medio de la modificación por ingeniería genética de anticuerpos pre-existentes (Jayson, G. *et al.* 2002. JNCI 94: 1484-1493; Ferrara, N. *et al.* 2005. Biochem Biophys Res Commun 333: 328-335), y los provenientes de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos humanos (Vitaliti, A. *et al.* 2000. Cancer Res 60: 4311-4314; Fuh, G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631). Las moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas con anticuerpos descritas en la presente invención también son novedosas en tanto reconocen un epítopo conformacional en el VEGF-A humano que es diferente de los definidos por otros anticuerpos que neutralizan el VEGF-A humano (Muller, Y. *et al.* 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94: 7192-7197; Muller, AY. *et al.* 1998. Structure 6: 1153-1167; Schaeppi, JM. *et al.* 1999. J Cancer Res Clin Oncol 125: 336-342; Brekken, RA. *et al.* 2000. Cancer Res 60: 5117-5124; Fuh, G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631; WO2005012359).

Los efectos anti-angiogénicos que se obtienen con la aplicación de las moléculas polipeptídicas recombinantes descritas en esta invención, y sus variantes

equivalentes, se producen debido a que interfieren con la interacción del VEGF-A humano con los receptores presentes en las células endoteliales vasculares activadas, lo que influye en la capacidad de estas para proliferar y mantener su estabilidad fisiológica.

5 En el contexto de esta invención se consideran "variantes equivalentes" aquellas moléculas polipeptídicas derivadas de otras asociaciones y manipulaciones de las secuencias contenidas en las RV 2H1RVCP (SEC ID No. 7) y 2H1RVCL (SEC ID No. 8) y otras RV homólogas contenidas en esta invención (SEC ID No. 13) que retienen la capacidad de reconocer específicamente al VEGF-A humano y de
10 interferir con su efecto biológico de estimulación del crecimiento de las células endoteliales y pro-angiogénico. Estas moléculas polipeptídicas pueden tomar la forma de otros fragmentos de anticuerpos recombinantes, como un scFv donde el dominio VL esté antepuesto al VH, o donde se empleen otros segmentos de unión (*linkers*) conocidos en el estado del arte, o como fragmentos F(ab')₂, Fabc, Facb, scFv diméricos, triméricos y tetaméricos (Winter G, Milstein C. 1991. Nature 349: 293-299; WO94/13804; de Haard, H *et al.* 1998. Adv. Drug Delivery Rev. 31:5-31). También cuando mediante la adición de otras secuencias derivadas de inmunoglobulinas se logran producir moléculas multivalentes (Bestagno M *et al.* 2001. Biochemistry 40: 10686-10692). Además, pueden estar en la forma de
15 moléculas de anticuerpo biespecíficas, donde una porción de las mismas conserven su especificidad para el VEGF-A humano y otra tenga una especificidad diferente, o en la forma de anticuerpos completos, donde estas secuencias se asocien a las regiones constantes de inmunoglobulinas humanas o de otra especie. Todas estas manipulaciones por ingeniería genética son conocidas para aquellos expertos en el
20 arte.

Se consideran también "variantes equivalentes" aquellas moléculas o variantes producidas por el llamado trasplante de CDR en que las secuencias de las CDR contenidas en las RV 2H1RVCP (SEC ID No. 7) y 2H1RVCL (SEC ID No. 8) y otras RV homólogas, como las contenidas por ejemplo en la SEC ID No. 13, se coloquen
30 artificialmente en el marco de secuencias que no sean las originales que las flanquean, como es revelado, por ejemplo, en EP-B-0239400, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y que esta manipulación no afecte su capacidad de

reconocer específicamente el VEGF-A humano y de interferir con el crecimiento de las células endoteliales y la pro-angiogénesis.

La molécula polipeptídica recombinante en forma de fragmento scFv (denominada scFv 2H1) reconoce específicamente diferentes isoformas de VEGF-A humano. En

esta, las RV de cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas están unidas genéticamente en ese orden por un segmento de unión (*linker*) de 16 aminoácidos, para formar la secuencia de ADN que se describe en SEC ID No 6. El fragmento scFv 2H1 fue obtenido a partir de un scFv homólogo que denominamos scFv 2H1-F, seleccionado de una biblioteca de scFv desplegados en fagos filamentosos, construida empleando un repertorio de RV de cadenas lambda humanas, por métodos semejantes a los ya descritos (Rojas G, *et al.* 2005. Biochem Biophys Res Commun 336:1207-1213). El sesgo intencional en el repertorio de RV de cadena ligera de la biblioteca empleada se diseñó para aumentar la probabilidad de encontrar anticuerpos diferentes a los reportados por otros autores, y que neutralizaran el VEGF-A por mecanismos distintos a los ya identificados.

En el proceso de selección a partir de la biblioteca se empleó una proteína de fusión que contiene la isoforma 121 del VEGF-A humano, la cual ha sido mutada en tres residuos, R82, K84, H86 que fueron sustituidos por ácido glutámico; de manera que afecta su interacción con el receptor KDR (Shen, B. *et al.* 1998. J Biol Chem 273: 29979-29985), como se demuestra en el Ejemplo1. Esta proteína de fusión recombinante (denominada P64_{47aa}-VEGF, SEC ID No. 3) se produjo en bacterias, se purificó de forma similar a la que se recuperaran aquellas especies moleculares que poseen la actividad biológica *in vitro* correspondiente al VEGF-A humano. Por tanto, el antígeno empleado en la presente invención es diferente a antígenos o inmunógenos usados por otros autores que han buscado anticuerpos monoclonales o recombinantes que reconozcan el VEGF humano. El dominio de proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, localizado en el extremo N-terminal de P64_{47aa}-VEGF, aumenta la inmunogenicidad, permite altos niveles de expresión en *E. coli* y que se produzcan formas diméricas como las que manifiestan la actividad biológica del VEGF humano. La zona mutada comprende un epítipo ya reconocido por otros anticuerpos reportados como neutralizantes de las funciones biológicas del VEGF-A (Muller, Y. *et al.* 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94: 7192-7197; Muller, AY. *et al.* 1998. Structure 6: 1153-1167).

De acuerdo a esta invención, el uso de la proteína de fusión P64_{47aa}-VEGF para la selección de sitios de unión al VEGF humano, a partir de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos scFv que contiene un repertorio de RV de cadena lambda, fue un factor determinante para poder identificar un fragmento de anticuerpo (scFv 2H1-F) que reconoce un epítipo conformacional de VEGF-A humano no descrito anteriormente.

Para producir la molécula polipeptídica scFv 2H1, la secuencia de ADN del fragmento scFv 2H1-F obtenido de la biblioteca se clonó desde el vector fagomidio correspondiente hacia un vector de expresión para periplasma. El scFv 2H1, con peso molecular aparente algo por encima de los 29 kDa, se recupera del medio de cultivo y del periplasma de las bacterias transformadas, y se purifica fácilmente mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos (en inglés "Metal ion affinity chromatography, abreviado IMAC) (Porath J. 1992. Prot. Expr. Purif. 3: 263-281). El vector de expresión pACR.1 añade al extremo C-terminal de la molécula scFv 2H1 un dominio de péptido *c-myc* que sirve como "marca" para propósitos analíticos, seguido de un dominio de seis histidinas para facilitar la purificación por IMAC.

La molécula polipeptídica recombinante en forma de fragmento Fab (denominada Fab 2H1-32) reconoce específicamente diferentes isoformas de VEGF-A humano. En esta, las secuencias de ADN codificantes para las RV del scFv 2H1, denominadas 2H1RVCP (SEC ID No. 7) y 2H1RVCL (SEC ID No. 8) se clonaron en el vector pFabHum-1, donde las mismas se asociaron genéticamente a las regiones constantes CH1 y Cλ de inmunoglobulinas humanas tipo IgG, respectivamente, como se describe en SEC ID No. 10 y SEC ID No. 9. El plasmidio pFabHum-1 es un vector bicistrónico construido para la expresión de fragmentos Fab con regiones constantes Cλ y CH1 humanas en el periplasma bacteriano. Las cadenas polipeptídicas producidas comprenden las RV y su región constante ligera o pesada particular, que se ensamblan para formar un fragmento Fab en el periplasma bacteriano, adonde son exportadas desde el citoplasma gracias a péptidos señales que aporta el vector. El ensamblaje del Fab periplasmático se basa en interacciones no covalentes entre las RV de cadena pesada y ligera, y entre los dominios CH1 y Cλ, y se refuerza mediante un enlace covalente tipo disulfuro entre dos cisteínas ubicadas cerca del C-terminal de las regiones CH1 y Cλ, aportado también por el vector. El Fab 2H1-32 tiene peso molecular aparente de 50 kDa.

Las moléculas polipeptídicas recombinantes bivalentes tipo "anticuerpo completo" denominadas scFv₂-Fc 2H1-8.2 y scFv₂-Fc 2H1-4.1 comprenden las secuencias de las RV del scFv 2H1, asociadas a una secuencia que codifica para 10 aminoácidos espaciadores, seguidos por la secuencia nucleotídica que codifica para las regiones bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana tipo IgG1 (SEC ID No. 14) y una secuencia muy semejante a la anterior (SEC ID No 13), con sólo ligeros cambios de bases en las RV, respectivamente. Estas moléculas se obtuvieron luego del clonaje de los productos de la RCP del gen que codifica para el scFv 2H1, excluyendo los dominios 3' de este, que codifican para el péptido *c-myc* y seis histidinas, en el vector pVSJG-HucFc. El vector pVSJG-HucFc está diseñado para la expresión de moléculas tipo "anticuerpo completo" que comprenden dos scFv idénticos asociados a un Fc de inmunoglobulina humana tipo IgG, en células de mamíferos. La cadena polipeptídica que da origen a estas moléculas bivalentes se transporta al retículo endoplásmico de las células de mamífero gracias a un péptido señal de inmunoglobulinas presente en el vector pVSJG-HucFc. El péptido se remueve en el retículo endoplásmico y dos cadenas polipeptídicas idénticas se asocian covalentemente a través de los enlaces disulfuro en las regiones bisagra, unión que se refuerza por las interacciones no covalentes de las regiones CH2 y CH3. Las moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 tienen peso molecular aparente semejante de entre 100 y 120 kDa. Las proteínas secretadas tienen su extremo aminoterminal cuatro aminoácidos adicionales (QVLK) aportados por el vector.

Los anticuerpos recombinantes de la invención, como el scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2, pueden producirse además en otros sistemas eucariotes, como es el caso de plantas transgénicas (Pujol, M. *et al.* 2005. Vaccine 23: 1833-1837).

En otro aspecto de la invención, las moléculas polipeptídicas recombinantes antes descritas reconocen de forma específica las isoformas 121 y 165 del VEGF-A humano, y no identifican el VEGF de ratón. Pueden unirse a VEGF-A humano soluble, a VEGF-A humano adsorbido en superficies sólidas, o a VEGF-A humano asociado o cercano a células humanas que lo producen, entre estas últimas aquellas presentes en tumores humanos creciendo en ratones desnudos (atímicos).

Las moléculas polipeptídicas de la presente invención, entre ellas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2, son capaces de interactuar con el VEGF-A humano activo, de forma tal que interfieren con el crecimiento de células endoteliales humanas *in vitro*, y de procesos de neo-angiogénesis *in vivo*, medido
5 esto último mediante los modelos de tapón (*pellet*) de Matrigel subcutáneo en ratones, y de trasplante de células tumorales humanas en ratones atímicos congénitos (desnudos). Las moléculas polipeptídicas recombinantes descritas en la invención no reconocen el VEGF-A de ratón, e interfieren efectivamente la asociación entre el VEGF-A humano y una forma soluble del receptor KDR. La
10 aplicación de las moléculas polipeptídicas scFv 2H1 y scFv₂-Fc 2H1-4.1 evita la aparición de neovascularización coroidea (NVC), o mejoran su evolución, en un modelo experimental de primate no humano donde la NVC se produce mediante fotocoagulación por laser. Las moléculas polipeptídicas Fab 2H1-32 scFv₂-Fc 2H1-8.2 pueden también producir efectos semejantes sobre la NVC, teniendo en cuenta
15 que su especificidad por el VEGF humano es similar a la de las moléculas polipeptídicas scFv 2H1 y scFv₂-Fc 2H1 4.1, y tienen efecto anti-angiogénico en los otros modelos *in vitro* e *in vivo*.

Las moléculas polipeptídicas recombinantes de la presente invención pueden conjugarse o acoplarse a una enzima o sus fragmentos, a un modificador de la
20 respuesta biológica, a una toxina o droga, o a isótopos radiactivos, que añaden a la molécula original una característica funcional adicional a la de unir al antígeno VEGF-A humano, pudiendo ser esta la capacidad de identificar y/o afectar la viabilidad de células que se encuentren en una zona anatómica de un organismo multicelular donde exista una alta concentración de VEGF-A humano, o en su
25 vecindad inmediata, o la de interactuar con formas de VEGF-A que estén asociadas a la membrana celular.

Las moléculas polipeptídicas objeto de esta invención, en tanto que poseen la capacidad de reconocer e interactuar con el VEGF-A humano y de interferir con su efecto pro-angiogénico y de estimulación de la proliferación de células endoteliales,
30 pueden también afectar otras funciones biológicas descritas para el VEGF humano, como aquellas en las cuales esta molécula actúa en la regulación negativa de la respuesta inmune (Chouaib S *et al.* 1997. Immunology Today 18:493-497).

Un conjunto de elementos hacen que las moléculas polipeptídicas objeto de la presente invención sean novedosas respecto a otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan el VEGF-A humano. Entre estos elementos están:

(a) las secuencias de bases que codifican para las RV que componen los sitios de unión al antígeno de las moléculas polipeptídicas descritas en esta invención, no se han reportado antes, y difieren de las de otros anticuerpos anti-VEGF-A. La secuencia de las CDR, en particular la CDR3 de la RV de cadena pesada, se diferencia notablemente de otras anteriormente reportada que son ricas en los aminoácidos aromáticos tirosina y/o triptofano, lo que se ha relacionado con el reconocimiento de un determinado epítopo (Fellouse F.A. *et al.* 2004. PNAS 101:12467-12472). En el caso de las moléculas polipeptídicas descritas en esta invención, el CDR3 de la RV de cadena pesada no posee tirosinas.

(b) la especificidad inmunoquímica por el VEGF-A humano de las moléculas polipeptídicas descritas en esta invención difiere de la de fragmentos Fab humanos obtenidos de otras bibliotecas (Fuh G. *et al.* 2006. J. Biol Chem 281: 6625-6631), que también reconocen VEGF-A de ratón.

(c) las moléculas polipeptídicas descritas en esta invención son muy dependientes para su reconocimiento del VEGF-A humano de que este posea una conformación dimerica biológicamente activa, como demuestra la pérdida del reconocimiento luego del tratamiento del VEGF-A con agentes reductores.

(d) las moléculas polipeptídicas descritas en esta invención reconocen un epítopo conformacional en el VEGF humano no descrito antes, si se compara con los epítopos reportados para otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan las funciones biológicas del VEGF-A humano (Muller Y *et al.* 1997. PNAS 94: 7192-7197; Muller AY. *et al.* 1998. Structure 6: 1153-1167; Schaeppi J.-M. *et al.* 1999. J Cancer Res Clin Oncol 125: 336-342; Fuh G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631; WO2005012359).

Como se muestra en el Ejemplo 9, el análisis *in silico* de las probables asociaciones entre la secuencia peptídica seleccionada específicamente por el fragmento de anticuerpo scFv 2H1, a partir de una biblioteca combinatoria de péptidos lineales de 12 aminoácidos, y los datos conocidos de las estructuras primaria y terciaria del VEGF-A humano; sugieren que el sitio de unión al antígeno del scFv 2H1 está

interactuando con un epítipo conformacional en la molécula de VEGF-A humano. La zona reconocida en la estructura terciaria del VEGF-A no coincide con los epítopes descritos para otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan el VEGF-A humano, y es por tanto novedosa. Esta definición epitópica abre también nuevas posibilidades de conocimiento sobre la compleja interacción entre el VEGF-A humano y su receptor KDR, que no está aún resuelta.

Las moléculas polipeptídicas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 descritas en la presente invención, y sus variantes equivalentes, son capaces de interactuar con el VEGF-A humano activo, e interferir con su efecto de estimulación de la neo-angiogénesis. Debido a ello, son útiles para el desarrollo de tratamientos novedosos para enfermedades que cursan con una angiogénesis anormal y excesiva, entre las cuales se encuentran: (a) el cáncer (tanto los tumores primarios como sus metástasis); (b) enfermedades oculares como la degeneración macular asociada a la edad, variante húmeda, los glaucomas neovasculares, y la retinopatía diabética y del recién nacido; (c) procesos inflamatorios agudos y crónicos como el asma, el distrés respiratorio, la endometriosis, la aterosclerosis, y los edemas tisulares; (d) enfermedades de origen infeccioso como las Hepatitis y el sarcoma de Kaposi; (e) enfermedades autoinmunes como la diabetes, la psoriasis, la artritis reumatoide, la tiroiditis; y (f) otras varias enfermedades y estados, tales como el rechazo al transplante de órganos, los hemangiomas y los angiofibromas.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de las moléculas descritas en la presente invención para producir una composición farmacéutica para la inhibición de la angiogénesis y el tratamiento de condiciones patológicas asociadas a la misma. Dicho tratamiento comprende la administración de una cantidad efectiva de las moléculas descritas en la presente invención a un ser humano.

En una realización de la invención, estas moléculas polipeptídicas recombinantes que reconocen el VEGF humano son útiles para el tratamiento de procesos neoplásicos malignos y sus metástasis. En una realización preferida, son efectivas en el tratamiento de carcinomas, sarcomas y tumores vascularizados. En el Ejemplo 12, la aplicación de moléculas descritas en esta invención tuvo efecto de inhibición del crecimiento de un carcinoma humano, trasplantado a ratones desnudos atímicos. Algunos ejemplos de tumores que pueden ser tratados con esta estrategia incluyen (pero no se limitan a): tumores epidermoides, tumores escamosos como los de cabeza y cuello, tumores colorectales, de próstata, de

mama, de pulmón (incluyendo los de células pequeñas y no pequeñas), de páncreas, tiroides, ovario e hígado. También resultan efectivos en el tratamiento de otros tipos de tumores, como el sarcoma de Kaposi, las neoplasias del sistema nervioso central (neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanomas, carcinomas renales y gastrointestinales, r

5 r

rabdomiosarcoma, glioblastomas, y leiomiosarcomas.

Debido a que las moléculas polipeptídicas recombinantes descritas en la presente invención poseen un reconocimiento epitópico del VEGF-A humano que las distingue del Bevacizumab como se presenta en el Ejemplo 5, y por tanto son diferentes en cuanto a la forma de interferir en la unión entre el VEGF-A humano y su receptor, las mismas pueden desarrollar efectos terapéuticos *in vivo* diferentes de otras moléculas que también actúan inhibiendo esta interacción. Está bien documentado que es posible lograr diferentes efectos terapéuticos *in vivo*, incluyendo los efectos colaterales del tratamiento, mediante anticuerpos producidos

10 r

contra un mismo antígeno, pero que reconozcan epítopes distintos, o que posean diferente afinidad (Allan D.G.P. 2005. The Oncologist 10: 760-761,). Igualmente, es conocido por las personas versadas en este campo de la técnica que moléculas que reconocen el VEGF humano por regiones diferentes a las identificadas por el anticuerpo recombinante humanizado Bevacizumab, pueden producir efectos de interferencia entre el VEGF y su receptor (Lee, F-H. *et al.* 2005. PNAS 102).

15 r

20 r

Es conocido que los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, como el Ranibizumab y el Bevacizumab, tienen aplicación en el tratamiento de otras enfermedades que cursan con una angiogénesis excesiva (Gaudreault, J. *et al.* 2005. Invest Ophthalmol Visual Sci 46:726-733; Costa, RA *et al.* 2006. Investig Ophthalmol Visual Sci 47:4569-4578). En una realización de la invención, las moléculas polipeptídicas recombinantes descritas son útiles en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, variante húmeda. Dos de las moléculas descritas en esta invención, específicamente scFv 2H1 y scFv₂-Fc 2H1-4.1, mostraron efecto preventivo y terapéutico (Ejemplo 14) sobre la neovascularización corioidea inducida por quemadura de laser en un modelo experimental de primate no humano. Respecto a las posibles diferencias en el potencial terapéutico de las moléculas referidas con las existentes en el estado del arte, cabe resaltar las diferencias intrínsecas al reconocimiento de un epítopo diferente, así como el hecho de que el scFv 2H1 tiene aproximadamente la mitad del tamaño molecular que el

25 r

30 r

fragmento Fab Ranibizumab, lo que le permite mejorar la penetración en las capas de la retina, hecho este que ha sido planteado como importante para un mejor efecto terapéutico. Igualmente, la molécula scFv₂-Fc 2H1-4.1 es menor en tamaño molecular que el Bevacizumab, lo que le otorga ventajas.

- 5 En otra realización de la invención, las moléculas polipeptídicas recombinantes descritas, o sus variantes equivalentes, se emplean en procedimientos diagnósticos *in vivo* para formas de cáncer humano que expresan VEGF, como por ejemplo, los adenocarcinomas de colon, pulmón o mama, y otros. Para ello, las moléculas polipeptídicas específicas al VEGF-A humano descritas en esta invención pueden
- 10 ser radiomarcadas, e inyectadas en la forma de agentes que permitan obtener imágenes demostrativas de la presencia y localización de tumores que expresan VEGF-A en el hombre. Para ello, se asocia una molécula polipeptídica como las descritas en esta invención a un isótopo radiactivo y se determina la unión de estas al tumor. El método puede comprender la administración de la molécula
- 15 polipeptídica radiomarcada a un individuo. Como se demuestra experimentalmente en la invención, el fragmento scFv 2H1 radiomarcado con ¹²⁵I se une al VEGF-A humano expresado por células tumorales humanas trasplantadas a ratones desnudos atímicos y se acumula específicamente en la zona del tumor. La reactividad con tejidos que expresan anormalmente altas cantidades de VEGF-A
- 20 humano se puede detectar mediante cualquier medio apropiado. Cuando se usa un radionúclido como ¹²⁵I, ¹¹¹In o ^{99m}Tc para marcar a las moléculas polipeptídicas descritas en la presente invención, estos se localizan preferiblemente en el tumor, y no en los tejidos normales, la presencia del marcaje radioactivo en el tejido tumoral puede ser detectado y cuantificado usando una cámara ganma o un contador
- 25 ganma. La calidad de la imagen del tumor obtenida se correlaciona directamente con la relación señal:fondo (Goldenberg DM. 1992. Int. J. of Biol. Markers, 7; 183-188). El uso experimental de ¹²⁵I se ejemplifica en esta invención, pero no limita el empleo de otros radionúclidos diferentes. Si estos radionúclidos tienen capacidad terapéutica, como el ¹³¹I, ⁹⁰Y, etc., las moléculas polipeptídicas descritas en la
- 30 presente invención, una vez radiomarcadas, proporcionan un efecto terapéutico beneficioso para el paciente, al alojarse en la zona del tumor productor de VEGF-A humano y afectar tanto a las células tumorales, como a las que componen sólo a los

vasos sanguíneos tumorales, así como a otros elementos celulares del estroma tumoral que producen VEGF-A.

De acuerdo a lo anterior, y como sugiere el mencionado ejemplo, las moléculas polipeptídicas descritas en la presente invención, o sus variantes equivalentes, acopladas a otros agentes pueden ser la base de métodos de tratamiento que comprenden su administración como medicamentos o composiciones farmacéuticas. De esta forma, estas moléculas acopladas químicamente o mediante ingeniería genética a radionúclidos terapéuticos, toxinas, drogas o modificadores de la respuesta biológica, pueden dirigir el efecto terapéutico de los elementos acoplados a zonas anatómicas con una concentración anormalmente alta de VEGF-A humano, como puede ser un tumor y su vecindad inmediata, y ejercer un efecto terapéutico. La cantidad a administrar, la frecuencia e intervalos de administración, dependen de la naturaleza y severidad de la enfermedad que es tratada, y estas decisiones son la responsabilidad de especialistas y otros doctores en medicina, que se basan en lo ya conocido en este campo de la técnica.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse aisladamente o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencial, lo cual depende de la enfermedad que vaya a ser tratada. Las composiciones farmacéuticas comprenden, además del ingrediente activo, un excipiente, tampón, estabilizador o "carrier" farmacéutico aceptados, u otros materiales bien conocidos para aquellos diestros en el arte. Estos materiales no son tóxicos, no interfieren con la eficacia del ingrediente activo, y su naturaleza precisa depende de la ruta de administración, sea oral, mucosal, o parenteral, por ejemplo, inyección endovenosa.

Las moléculas descritas en la presente invención, o sus variantes equivalentes, se producen por la expresión del ácido nucleico que las codifica. Por tanto, también son parte de la presente invención las secuencias de ácido nucleico que codifican para cualquiera de las moléculas polipeptídicas antes descritas y los procedimientos para la expresión de dicho ácido nucleico. En una realización preferida, el ácido nucleico codifica, principalmente (aunque no exclusivamente), para las secuencias de bases que se ejemplifican para las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2.

Para la expresión recombinante de las moléculas descritas en la presente invención, o sus variantes equivalentes, se pueden escoger o construir vectores apropiados

que contengan las secuencias regulatorias adecuadas al caso, incluyendo promotor, terminador, aumentador (*enhancer*), poliadenilación, genes marcadores y otras secuencias pertinentes. Los vectores pueden ser plásmidos.

5 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema del plásmido pACR.1, empleado para la producción de fragmentos solubles tipo scFv en el periplasma y medio de cultivo de *E. coli*. El vector tiene un promotor LacZ, un sitio de unión a ribosomas (en inglés Ribosome Binding Site, abreviado RBS) y el péptido señal (SP) *pe/B*.

10 **Figura 2.** Secuencia de ADN (SEC ID No.6) que codifica para el fragmento de anticuerpo recombinante scFv 2H1, producido en el vector pACR.1 de *E. coli*. Las primeras 354 bases conforman la región variable (RV) de cadena pesada de inmunoglobulina humana (denominada 2H1RVCP, SEC ID No.7), seguidas por 48 bases que codifican para el segmento de unión (*linker*), que continúan con 333
15 bases que codifican para la RV de cadena ligera de inmunoglobulina humana (denominada 2H1RVCL, SEC ID No. 8), para terminar con 69 bases que codifican para los aminoácidos que proporciona el sitio de clonaje, el péptido *c-myc* y seis histidinas contenidas en el vector. Las bases subrayadas representan las anotaciones de las CDR, según Kabat *et al.* (Sequences of Immunological Interest, Department of Health and Public Services, Fifth Edition, 1991), en el orden (de
20 arriba abajo): CDR1 de RV de cadena pesada (RVP), CDR2 de RVP, CDR3 de RVP, CDR1 de RV de cadena ligera (RVL), CDR2 de RVL y CDR3 de RVL.

Figura 3. Resultados de la expresión del scFv 2H1 en *E. coli* BL-21. De izquierda a derecha se observan el patrón de peso molecular (66, 45, 35, 29, 20 y 14,2 kDa; carril 1); un scFv control (scFv M3; carril 2), el sobrenadante de cultivo de las bacterias transformadas con el plásmido pACR.1-scFv 2H1 (carril 3), donde se ve una banda reforzada que migra algo por encima de 29 kDa, y en el carril 4, el sobrenadante de cultivo de las bacterias transformadas con el plásmido pACR.1 sin el inserto.

30 **Figura 4.** Resultados de la purificación del scFv 2H1 mediante IMAC. La Figura 4A es una electroforesis en geles de poliacrilamida (en inglés "Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis", abreviado SDS-PAGE) al 12% donde se observan, de izquierda a derecha: Un scFv control (scFv M3), de talla molecular

de alrededor de 29 kDa (carril 1), Material de partida que contiene el scFv 2H1 (carril 2), y scFv 2H1 eluido con alta pureza (carril 3). En B se observa un Western blot realizado a partir de una réplica de la electroforesis anterior. Se empleó para la detección el anticuerpo monoclonal 9E10, que identifica el dominio *c-myc* presente en estas proteínas.

Figura 5. Resultados de un ELISA de competencia donde se evaluó la capacidad del scFv 2H1 purificado para bloquear el acceso de un receptor soluble de VEGF (KDR-Fc) al ligando (VEGF-A humano), este último adsorbido a la fase sólida. Se utilizaron diferentes concentraciones de scFv 2H1, hasta 80 µg/mL y como control negativo un scFv anti-HBsAg (Antígeno de superficie del virus de hepatitis B). En el ensayo se detecta el KDR-Fc unido al VEGF-A humano en la fase sólida mediante anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa (Sigma).

Figura 6. Esquema del plasmidio pFabHum-1, empleado para la producción de fragmentos solubles tipo Fab en el periplasma y medio de cultivo de *E. coli*.

Figura 7. Secuencia de ADN (SEC ID No. 9 y SEC ID No. 10) de las dos cadenas que codifican para formar la molécula madura del fragmento de anticuerpo Fab 2H1-32 que se ensambla en el periplasma bacteriano. En la Figura 7A y en el sentido 5'-3', aparece la secuencia codificante para una región variable de cadena ligera de inmunoglobulinas, seguida por la secuencia codificante de un dominio C_L de inmunoglobulina. Las bases subrayadas representan las anotaciones de las CDR en el orden: CDR1 de RV de cadena ligera (RVL), CDR2 de RVL y CDR3 de RVL. En la Figura 7B, aparecen las secuencias codificantes para una región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas, un dominio CH1 de inmunoglobulina humana, seis histidinas y un péptido *c-myc*. Las bases subrayadas representan las anotaciones de las CDR, en el orden: CDR1 de RV de cadena pesada (RVP), CDR2 de RVP y CDR3 de RVP.

Figura 8. Mapa del plasmidio pVSJG-HucFc, empleado para la obtención de moléculas divalentes tipo "anticuerpo completo", a partir del clonaje de fragmentos scFv entre los sitios de restricción Afl II y Xba I (Figura 8A). Representación esquemática del tipo de molécula que se produce por las células de mamífero transfectadas con este plasmidio, una vez que se ha clonado en este un fragmento scFv dado (Figura 8B).

Figura 9. Secuencia de ADN (SEC ID No. 13) que codifica para la molécula madura tipo anticuerpo denominada scFv₂-Fc 2H1-4.1. En el sentido 5'-3', aparecen una región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas, seguida por un segmento de unión (*linker*) y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulinas, para
5 terminar en este orden con un espaciador que codifica para 10 aminoácidos, y los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana tipo IgG1. Las bases subrayadas representan las anotaciones de las CDR en el orden (de arriba abajo): CDR1 de RV de cadena pesada (RVP), CDR2 de RVP, CDR3 de RVP, CDR1 de RV de cadena ligera (RVL), CDR2 de RVL y CDR3 de RVL.

10 **Figura 10.** Secuencia de ADN (SEC ID No. 14) que codifica para la molécula madura tipo anticuerpo denominada scFv₂-Fc 2H1-8.2. En el sentido 5'-3', aparecen una región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas, seguida por un segmento de unión (*linker*) y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulinas, para terminar en este orden con un espaciador que codifica para
15 10 aminoácidos, y los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana tipo IgG1. Las bases subrayadas representan las anotaciones de las CDR en el orden (de arriba abajo): CDR1 de RV de cadena pesada (RVP), CDR2 de RVP, CDR3 de RVP, CDR1 de RV de cadena ligera (RVL), CDR2 de RVL y CDR3 de RVL.

Figura 11. Reconocimiento específico de los péptidos sobre fagos, en cuanto al sitio
20 de unión del fragmento scFv 2H1, en un ensayo tipo ELISA donde se evaluó la unión al fragmento adsorbido a una superficie sólida en presencia de un exceso de VEGF (Peprotech). En la Figura se muestran 10 clones de fagos portadores de péptidos, representativos del comportamiento que exhibieron los 35. En el experimento las muestras de fagos se incubaron o no con VEGF en solución.

25 **Figura 12.** Mapeo de los residuos que definen principalmente el epítopo reconocido en la molécula del VEGF-A por el scFv 2H1, en comparación con aquellos descritos para otros anticuerpos. Para ello se emplea un diagrama representativo de la estructura terciaria del VEGF-A humano en su conformación dimérica, con hélices alfa, cadenas beta y lazos. Las dos moléculas idénticas del dímero aparecen como
30 gris claro y negro. La posición de los residuos definidos como indicativos principales del epítopo reconocido por el scFv 2H1 se marcan sólo en la cadena gris claro, y aparecen en negro, en representación Van der Waals (VDW). Los residuos reconocidos por otros anticuerpos se marcan como VDW gris claro en las Figuras A

a la D. En la Figura 12E muestra la posición de aminoácidos contiguos (en VDW gris claro) que son diferentes cuando se comparan las secuencias del VEGF-A humano y de ratón, en relación con la posición del epítotope definido por los residuos indicativos principales para el scFv 2H1 (en VDW negro).

5 **Figura 13.** Capacidad de las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2, para interferir con el efecto estimulador del VEGF-A humano en el crecimiento de células endoteliales humanas de cordón umbilical (HuVEC). Las moléculas purificadas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2, se añadieron a tres concentraciones diferentes (barra rayada: 2 µg/mL; barra

10 completa: 1 µg/mL y barra vacía: 0,5 µg/mL) con 10 ng/mL de VEGF-A humano (Peprotech).

Figura 14. Actividad anti-tumoral de las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2 a las dosis de: 2,5 mg/kg de peso (Figura 14A) y 25 mg/kg de peso (Figura 14B). Los puntos en las curvas se refieren a la media de los

15 volúmenes estimados para los 5 animales/grupo. Control negativo: anticuerpo monoclonal no relacionado CB-Hep.1 (anti-HBsAg) a la dosis mayor.

Figura 15. Porciento de la dosis inyectada por gramo de tejido, después de 24 horas (primeras dos barras en cada tejido) y 48 horas (segundas dos barras en cada tejido) de ser inoculados el fragmento scFv 2H1 (barras oscuras) o el fragmento

20 scFv Hep.1 (barras claras) radiactivos (¹²⁵I) a ratones desnudos con tumores derivados de células humanas tumorales A431. Cada barra representa la media de los conteos recuperados de los órganos/tejidos recuperados de 5 ratones.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos

25 **Ejemplo 1. Clonaje, expresión en bacterias y purificación de la isoforma 121 del VEGF humano fusionada a P64K.**

(a) Clonaje de la isoforma 121 del VEGF humano

Para el clonaje de la isoforma 121 del VEGF se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) empleando la enzima Taq DNA Polymerase (Roche) y el

30 procedimiento recomendado por el fabricante. En la RCP se usaron los oligonucleótidos sintéticos # 1 (SEC ID No. 1) y # 2 (SEC ID No. 2) que aparecen en la Tabla I, como cebadores.

Tabla 1.- Cebadores empleados en la RCP de la isoforma 121 del VEGF humano.

Oligonucleótido	Secuencia
# 1 (SEC ID No.1)	5'...GATCTGCTAGCCGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGG.. .3'
# 2 (SEC ID No. 2)	5'...GGGGGATCCCCGCCTCGGCTTGTCAC...3'

En la técnica se empleó como molde el ADN del plasmidio pVEGF (Ojalvo, A. G. *et al.* 2003. *Electronic J. Biotechnol.* 6, 208–222), al cual se le introdujeron mediante RCP las mutaciones correspondientes para que los aminoácidos R82, K84 y H86 se sustituyeran por ácido glutámico.

La banda correspondiente al producto de la amplificación se extrajo de gel de agarosa al 2%. Luego de la digestión de la banda con las endonucleasas Nhe I y BamH1, el ADN se purificó y clonó en el vector pM238 (Yero, D. *et al.* 2006. *Biotechnol. Appl. Biochem* 44:27-34). Mediante este vector, las proteínas se expresan en bacteria como proteínas de fusión con un dominio N-terminal de 47 aminoácidos de la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*. El plasmidio resultante (P64_{47aa}-VEGF) se secuenció automáticamente y se determinó que este contenía solamente las mutaciones descritas arriba, como muestra la SEC ID No. 3, con respecto a las secuencias de aminoácidos reportadas en la base de datos del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (www.embl-heidelberg.de) para la zona de la isoforma del VEGF humano clonada.

(b) Expresión de la proteína de fusión en *E. coli*

Se extrajo ADN plasmídico del clon P64_{47aa}-VEGF y se usó para transformar la cepa de *E. coli* BL21. Varias colonias resultantes se inocularon en 50 mL de medio LB con Ampicillina y Triptófano y se crecieron durante 5h a 37°C. Posteriormente, se inocularon 25 mL de estos cultivos en 250 mL de medio M9 enriquecido con Ampicillina e incubaron nuevamente durante 2 h a 37°C. La inducción se realizó por la adición de ácido 3 β-indolacrílico (40 µg/mL). Las células se colectaron 8 h después, y tras disrupción ultrasónica la proteína de interés quedó en el precipitado

de ruptura. La solubilización se realizó con tampón fosfato de sodio más urea 6M. El sobrenadante se sometió a IMAC en matriz Ni-NTA (QIAGEN).

Las fracciones eluidas se evaluaron mediante SDS-PAGE, observándose dos bandas que comprenden más del 98% de la proteína en la preparación, con las
5 tallas de alrededor de 26 kDa, 54 kDa y mayores. La primera talla corresponde a un monómero, mientras que la segunda a una molécula dimérica, y las mayores a agregaciones superiores. La fracción de elución se dializó en PBS, se sometió a una cromatografía en una columna Superosa F12 (Pharmacia), para seleccionar
10 exclusivamente las especies de mayor peso molecular aparente (mayor o igual que 54 kDa), que se denominaron P64_{47aa}-VEGF. Esta preparación se congeló a -20°C para su uso posterior.

(c) Ensayo de unión a receptor con la proteína de fusión P64_{47aa}-VEGF.

Se recubrió una inmunoplaaca Maxisorp (Nunc) de 96 pocillos con la proteína de fusión P64_{47aa}-VEGF o VEGF-A humano (Peprotech), ambos a 5 µg/mL en PBS por
15 16h a 4°C. La placa se bloqueó a 22°C con PBS-leche al 4% durante 1h. El receptor humano soluble KDR-Fc (Sigma) se diluyó en PBS-leche al 4% en diferentes concentraciones, se añadió a la placa, y se incubó durante 1h a 22°C. Luego de lavados repetidos, la unión del receptor al recubrimiento se reveló empleando anticuerpos de cabra anti-IgG humana, conjugados con peroxidasa (Sigma),
20 seguido de una solución de sustrato compuesta de *orto*-fenilendiamina 0,5 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 0,015%, en tampón citrato, pH 5,5. La lectura se realizó en un lector de placas de ELISA a 492 nm, y los valores medios de absorbancia se estimaron a partir de tres pozos réplica por muestra experimental.

La Tabla 1a demuestra que la unión del receptor soluble se limitó a la fase sólida recubierta con el VEGF-A humano no mutado de Peprotech. La proteína de fusión
25 P64_{47aa}-VEGF, en la cual se introdujeron *exprofeso* tres mutaciones críticas (los residuos R82, K84, y H86 se sustituyeron por ácido glutámico) no se identificó por el KDR soluble, un resultado que coincide con las predicciones hechas por Shen et al. (Shen, B. *et al.* 1998. J Biol Chem 273: 29979-29985), y que hace nuestro antígeno
30 diferente de otros reportados en la literatura y usados para el desarrollo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan el VEGF humano.

Tabla 1a. Ensayo de unión para KDR-Fc, usando VEGF-A o la proteína de fusión P64_{47aa}-VEGF como recubrimiento en ELISA.

KDR-Fc (µg/mL)	Recubrimiento de placas de ELISA	
	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Proteína de fusión P64 _{47aa} -VEGF
0 (control negativo)	0,102	0,115
1,0	1,48	0,120
0,5	1,27	0,118
0,25	1,04	0,122
0,125	0,760	0,109

Ejemplo 2. Inmunización de ratones BALB/c con la proteína P64_{47aa}-VEGF y evaluación de la capacidad de los sueros para reconocer VEGF isoforma 121 humano comercial.

5 La potencialidad de la proteína de fusión P64_{47aa}-VEGF de generar anticuerpos neutralizantes al VEGF se evaluó mediante la inmunización de 10 ratones BALB/c hembra (CENPALAB, Habana) de entre 8 y 10 semanas de edad. Los animales se inmunizaron con 100 µg de la proteína P64_{47aa}-VEGF por dosis, empleando el adyuvante conocido como VSSP (Estévez F. *et al.* 1999. Vaccine 99: 190-197), en
10 un esquema de cuatro dosis, separadas por 7 días, por vía subcutánea. Una semana después de la última inmunización se realizó extracción de sangre a los animales y el suero se separó, se alicuotó y conservó a -20°C.

Para determinar el reconocimiento específico del VEGF por el suero de los animales inmunizados con la proteína P64_{47aa}-VEGF se realizó un ELISA con la isoforma 121
15 de VEGF-A humano (Peprotech). El mismo se inmovilizó en una inmunoplaaca de 96 pozos Maxisorp (Nunc) a una concentración de 1 µg/ml en PBS, durante 16 horas a 4°C. La placa se bloqueó a 22°C con PBS-leche al 4% durante 1h. Luego se incubaron diluciones seriadas del suero, en PBS-leche al 4% por 1h. La placa se lavó y se incubó con un conjugado anti-ratón peroxidasa (Sigma). La reacción se
20 reveló con la solución sustrato compuesta por *orto*-fenilendiamina 0,5 mg/mL y peróxido de hidrógeno 0,015%, en tampón citrato fosfato; pH 5,5. El suero de los animales inmunizados con la proteína P64_{47aa}-VEGF reconoció de manera específica el VEGF humano comercial con títulos de hasta 1:32 000.

Ejemplo 3. Selección de sitios de unión de anticuerpos contra el VEGF humano.

Para la selección de sitios de unión contra la isoforma 121 del VEGF humano, se utilizó una biblioteca de fragmentos de anticuerpos del tipo Fv de cadena sencilla (scFv) humanos, sobre fagos filamentosos, construida especialmente para esta invención. En ella, las regiones variables (RV) de cadena ligera humana presentes en los scFv son las correspondientes a un repertorio de RV de tipo lambda. En el proceso de construcción de esta biblioteca sesgada a RV de cadena lambda, y de acuerdo a procedimientos reportados en la literatura (Rojas G, *et al.* 2005. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1207-1213), los genes condicantes para el repertorio de RV de cadena pesada se recuperaron de una semibiblioteca y se ligaron al ADN plasmídico de otra semibiblioteca de regiones V λ a una relación vector : inserto de 1:1. Los productos de la ligazón se electroporaron a células TG1 para obtener la biblioteca final. La presencia y tamaño de los insertos se determinó en una muestra de 30 colonias, con oligonucleótidos que se asocian a las regiones flanqueantes de los scFv clonados.

En las selecciones a partir de esta biblioteca se empleó como antígeno la proteína recombinante P64_{47aa}-VEGF. La mezcla de fagos que conforman la biblioteca se sometió previamente a un proceso de depleción con un exceso (1 mg/mL) del antígeno P64k en solución, para eliminar los scFv no deseados específicos para esta proteína. La mezcla depleta se enfrentó a la proteína P64_{47aa}-VEGF inmovilizada en inmunotubos Maxisorp (Nunc). Para ello, los inmunotubos se recubrieron con 10 μ g/mL de la proteína en PBS, a 4°C durante la noche, y luego se bloquearon con PBS-leche descremada al 4%. Los fagos que no se unieron se eliminaron mediante 20 lavados con una solución de PBS-Tween al 0,1%, seguido por 2 lavados con PBS. A continuación, los fagos unidos se eluyeron con una solución de 100 mmol/L de trietilamina durante 10 min, que fue inmediatamente neutralizada con 0.5 mol/L de Tris (pH 7,5). Los fagos eluidos se amplificaron en la cepa TG1 de *E. coli* y se usaron como material de partida en el próximo ciclo de selección. Este procedimiento se repitió 3 veces bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se seleccionaron al azar colonias individuales de TG1 infectadas con los fagos eluidos del segundo y tercer ciclo de selección para producir fagos a escala de 96 pozos. La capacidad de estos clones de fagos que portan fragmentos scFv de anticuerpo para unir P64_{47aa}-VEGF se evaluó por un ELISA. Para ello se

recubrieron placas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) con 10 µg/mL de P64_{47aa}-VEGF, y luego se bloquearon. Los fagos diluidos en PBS-leche descremada al 4% se incubaron durante 1 hora a 22°C en las placas, seguido por varios lavados. Los fagos unidos se detectaron mediante la adición de anticuerpos anti-M13 conjugados a peroxidasa (Amersham) por 1 hora a 22°C. Luego de varios lavados, la reacción se reveló con la adición de solución sustrato. La absorbancia se leyó a 492 nm en un lector de microplacas. De los 96 clones de fagos evaluados mediante este ELISA, 87 de ellos resultaron positivos. El ADN que codifica para los fragmentos de anticuerpos tipo scFv que portan los clones de fagos que resultaron positivos por ELISA se amplificó por RCP y sometió a un análisis de restricción con la enzima BstN-I. El producto de esta digestión se observó en un gel de agarosa al 4%. De este análisis se identificaron 7 patrones de restricción diferentes y se seleccionó un clon representativo de cada patrón. Para la producción de los clones de fagos seleccionados se infectaron bacterias TG-1, que se crecieron a 28°C por 16 horas. Se precipitaron los fagos contenidos en el sobrenadante de los cultivos con una solución de PEG 5000 en 2,5 M de NaCl; y se alicuotaron para la caracterización inmunoquímica que se describe a continuación.

Ejemplo 4. Caracterización inmunoquímica de los scFv en fagos seleccionados de la biblioteca.

(a) Reconocimiento de diferentes isoformas de VEGF humano y murino

Para determinar el reconocimiento específico del VEGF humano, isoformas 121 y 165, así como de la isoforma 165 del VEGF murino, los 7 clones de fagos portadores de fragmentos scFv se sometieron a un ensayo ELISA. Las inmunoplaacas se recubrieron con las isoformas 121 y 165 de VEGF humano (Peprotech) y la isoforma 120 de VEGF murino (R&D) a una concentración de 1 µg/ml en PBS. Después de bloquear las placas, se añadieron los fagos purificados como se describe arriba y diluidos en PBS-leche descremada al 4%, y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Luego de varios lavados, los fagos unidos se detectaron mediante la adición de anticuerpos anti-M13 conjugados. La reacción se reveló y midió como se describe en el Ejemplo 2. Se empleó como control negativo una muestra de la mezcla de fagos que conforman la biblioteca antes de seleccionar, precipitada como se ha descrito anteriormente. Como se observa en la Tabla 2 los 7 clones de fagos seleccionados para esta caracterización reconocen específicamente

las isoformas 121 y 165 del VEGF humano. De ellos, los clones 2H1-F y 3C1 no reconocen a la isoforma 120 del VEGF murino. La Tabla muestra la capacidad de reconocimiento de los clones, clasificándose como positivos (+) aquellos que dieron densidades ópticas en el ELISA por encima de 5 veces el control negativo.

5

Tabla 2. Reconocimiento de diferentes isoformas de VEGF-A humano y del VEGF-A murino por 7 clones de scFv desplegados en fagos filamentosos.

Clón de fago	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Isoforma 165 de VEGF-A humano	Isoforma 120 de VEGF-A de ratón
3C1	+	+	-
2B2	+	+	+
2D2	+	+	+
2E1	+	+	+
3E8	+	+	+
2H1-F	+	+	-
2E3	+	+	+

(b) Reconocimiento diferenciado entre VEGF-A humano nativo y reducido

- 10
- Para estudiar la importancia del plegamiento del VEGF-A en su forma nativa de homodímero, respecto al reconocimiento de los distintos fragmentos de anticuerpos seleccionados de la biblioteca, se realizó un ELISA recubriendo con VEGF humano, isoforma 121 (Peprotech). Después de bloqueada la placa, la mitad de los pozos se trató con una solución de 50mM de ditiotreitól en PBS-leche al 4% durante 1 hora a
- 15
- 22°C y a la otra mitad solo se le añadió PBS-leche al 4%. Después de varios lavados, a los pozos donde se había reducido el VEGF-A con la solución de ditiotreitól se le adicionó una solución de iodoacetamida a 100 mM en PBS-leche al 4% y se incubó por 1 hora a 22°C. El resto de los pozos se mantuvo con PBS-leche al 4%. Después de lavar nuevamente la placa, se añadieron los fagos purificados,
- 20
- diluidos en PBS-leche al 4%, tanto en los pozos tratados con ditiotreitól como los no

tratados y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Luego de varios lavados, los fagos
unidos se detectaron mediante la adición de anticuerpos anti-M13 conjugados a
peroxidasa. Se empleó como control negativo una muestra de la mezcla de fagos
que conforman la biblioteca antes de seleccionar. La Tabla 3 muestra que se
5 observan 3 patrones: uno en que no se afectó el reconocimiento frente al VEGF
reducido (ejemplificado por el clon 3C1), un segundo patrón en el que se observó
una afectación parcial (ejemplificado por los clones 2B2 y el 3E8) y un tercero donde
se evidenció una afectación completa del reconocimiento ante la forma reducida del
VEGF (ejemplificado por los clones 2D2, 2E1, 2H1-F y 2E3). Se tomó la capacidad
10 de reconocimiento de los clones para el VEGF-A, en términos de la Densidad Óptica
(a 492 nm) promedio de tres pozos obtenida en el experimento, y como referencia
aquella producida por el control negativo.

Tabla 3. Reconocimiento de VEGF-A humano tratado con ditiotreitól por 7 clones de scFv desplegados en fagos filamentosos.

Denominación del clón de fago	VEGF-A humano sin tratamiento (nativo)	VEGF-A humano ¹⁵ tratado con ditiotreitól (reducido)
3C1	2,125	2,096
2B2	2,015	0,600
2D2	1,289	0,121
2E1	1,831	0,142 ₂₀
3E8	1,109	0,770
2H1-F	1,250	0,103
2E3	1,803	0,125
Mezcla de fagos sin seleccionar	0,122	0,103

25 (c) ELISA de competencia entre una forma soluble del receptor de VEGF (KDR-Fc)
y los fagos seleccionados, por el VEGF-A humano

Se evaluó mediante un ELISA de competencia la capacidad de los clones de fagos seleccionados para bloquear el acceso de un receptor soluble de VEGF al antígeno. Para ello se recubrieron inmunoplasacas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) con la isoforma 121 de VEGF-A humano (Peprotech). Las placas se bloquearon y posteriormente los pozos se incubaron con una mezcla del clon de fago correspondiente, diluido en PBS-leche al 4%, y 2 µg/mL de receptor soluble (KDR-Fc, Sigma), o sólo con el vehículo (PBS-leche al 4%). Los fagos unidos se detectaron con un conjugado anti-M13 peroxidasa (Amersham). Como se muestra en la Tabla 4 el clon que mostró más evidencias de bloquear la unión del KDR-Fc al VEGF-A fue el 2H1-F. La Tabla muestra la capacidad de reconocimiento de los clones para el VEGF-A, en términos de la Densidad Optica (a 492 nm) promedio de tres pozos obtenida en el experimento, tomándose como referencia aquella producida por el control negativo

Tabla 4. Reconocimiento de VEGF-A humano luego de mezclar los 7 clones de scFv desplegados en fagos filamentosos, de manera individual, con 2 µg/mL de KDR-Fc.

Denominación del clón de fago	Con KDR-Fc 2 µg/mL	Sin KDR-Fc
3C1	1,269	1,290
2B2	2,261	2,213
2D2	1,161	1,160
2E1	1,293	1,401
3E8	0,828	0,993
2H1-F	0,577	1,149
2E3	0,884	1,088
Mezcla de fagos sin seleccionar	0,121	0,115

Ejemplo 5. Expresión del fragmento scFv 2H1 en *E. coli*, purificación y caracterización de su reconocimiento para el VEGF humano.

(a) Clonaje del scFv 2H1 en el vector pACR.1 y secuenciación

El vector pACR.1 es un plasmidio diseñado para la expresión de fragmentos de anticuerpos hacia el periplasma de *E. coli* (Figura 1). Como elementos principales tiene el promotor LacZ, un péptido señal, sitios de restricción NcoI y Not I para la inserción del gen del fragmento, un dominio codificante del péptido *c-myc* y una
5 secuencia que codifica para 6 histidinas, esta última con vistas a la purificación de los productos de expresión mediante IMAC. El ADN correspondiente al fagomidio que porta el scFv denominado 2H1-F se empleó como molde para la RCP. Este procedimiento se realizó con la enzima ProofStart (Stratagene), y el procedimiento recomendado por el fabricante. En la técnica se emplearon los oligonucleótidos
10 sintéticos # 3 (SEC ID No.4) y # 4 (SEC ID No.5) como cebadores (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos sintéticos para la amplificación y modificación del scFv 2H1-F contenido en el vector de fagomidio, con vistas a su clonaje en el vector pACR.1.

Oligonucleótido	Secuencia
# 3 (SEC ID No. 4)	5'...CTATTCTCCCATGGCACAG...3'
# 4 (SEC ID No. 5)	5'...TTCTGTATGAGGTTTTGC...3'

A partir de la amplificación se obtuvo una banda de la talla esperada (700 pb), que se purificó a partir de gel de agarosa al 1% empleando el kit de extracción de ADN
20 de geles de QIAGEN, se digirió Nco I y Not I (Promega) y se repurificó para su ligazón. El vector pACR.1 se digirió Nco I y Not I (Promega), y se ligó con la banda predigerida empleando T4 ADN ligasa (Promega). El producto de la reacción de ligazón se usó para transformar *E. coli* competentes (cepa XL-1Blue; Stratagene) mediante electroporación. Las células transformadas se plaquearon en medio sólido
25 selectivo y se crecieron a 37°C. Los métodos empleados son ampliamente conocidos (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition. 1989. Sambrook, Fritsch y Maniatis).

Se purificó ADN plasmídico a partir de distintas colonias (QIAGEN MiniPrep kit), y se chequeó por digestión con las enzimas de restricción ya descritas para el producto
30 esperado de la ligazón. Se escogieron varios plasmidios para obtener la secuencia consenso de ADN del scFv 2H1, empleando secuenciación automática y cebadores específicos que hibridan externamente a las regiones de clonaje del vector pACR.1.

La secuencia de ADN consenso obtenida para el fragmento completo (VH-linker-VL-
c myc-histidinas) denominado scFv 2H1 (SEC ID No. 6) aparece en la Figura 2. El
plasmidio representativo de esta construcción se denominó pACR.1-scFv 2H1. Esta
misma Figura presenta las secuencias individuales de la RV de cadena pesada
5 (denominada 2H1RVCP; SEC ID No. 7), y de cadena ligera (denominada 2H1RVCL;
SEC ID No. 8). Según la clasificación de Kabat *et al.*, la 2H1RVCP pertenece al
Subgrupo I de regiones variables de inmunoglobulinas humanas y la 2H1RVCL
puede clasificarse en varios grupos de regiones variables de inmunoglobulinas
humanas tipo lambda. Aparecen subrayadas en la Figura las secuencias de las
10 CDR, anotadas según la clasificación de Kabat *et al.*

(b) Expresión del scFv 2H1 en *E. coli*

Se empleó el pACR.1-scFv 2H1 para transformar células competentes BL21 de *E.*
coli. Esta cepa permite la expresión de la proteína heteróloga en el periplasma y/o el
medio de cultivo. La transformación se plaqueó en medio sólido selectivo y se
15 permitió el crecimiento a 37°C. Una colonia representativa de la construcción se
creció en medio líquido y al alcanzar 1 de DO_{530nm} se indujo por 12 horas añadiendo
1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (en inglés "isopropyl-beta-D-
thiogalactopyranoside", abreviado IPTG) al medio de cultivo. Las células se
centrifugaron y el contenido periplasmático se aisló mediante shock osmótico y
20 sonicación breve. Tanto la fracción periplasmática, como el sobrenadante de cultivo
se evaluaron en SDS-PAGE al 12%, en condiciones de desnaturalización. Este
ensayo reveló la expresión de una proteína de peso molecular aparente por encima
de 29 kDa, según lo esperado, cuando se compara con el patrón de pesos
moleculares, y con un scFv anti-antígeno carcinoembrionario [scFv-M3]; (Pérez L. *et*
25 *al.* 2006. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43: 39-48) (Figura 3). La mayoría del fragmento
se encuentra en el sobrenadante de cultivo.

(c) Purificación del fragmento scFv 2H1 utilizando IMAC

Para la purificación se aprovechó la presencia del dominio de seis histidinas en la proteína recombinante, aportado por el vector pACR.1. Estas secuencias confieren a las proteínas una afinidad muy alta por iones metálicos (por ejemplo, Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2}) que pueden ser quelados a diferentes soportes cromatográficos. Las bacterias recombinantes transformadas con el vector pACR.1-scFv 2H1 se centrifugaron y el sobrenadante se dializó por 72 horas en el tampón de acomplamiento (NaH_2PO_4 50mM, 300mM NaCl, pH 7-8). Las preparaciones conteniendo el scFv se aplicaron directamente a una matriz de Agarose-NTA (QIAGEN). La Figura 4A demuestra que se obtiene una proteína con una alta pureza que sigue migrando algo por encima de 29 kDa. Las fracciones obtenidas se evaluaron por Western Blot utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal específico (9E10) contra el péptido derivado del *c-myc* que contiene esta proteína y en el patrón (scFv-M3), seguido por anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma). La Figura 4B demuestra que el AcM 9E10 detectó al scFv 2H1 sin presentarse degradaciones importantes.

(d) Reconocimiento específico del VEGF humano por el scFv 2H1 en ELISA

Para ello se recubrieron inmunoplasacas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) con las isoformas 121 y 165 de VEGF humano (Peprotech) y la isoforma 120 de VEGF de ratón (R&D) a una concentración de 1 μ g/ml en PBS durante 16 horas a 4°C. Después de bloqueadas las placas con PBS-leche descremada al 4% se añadió el scFv 2H1 purificado, a distintas concentraciones en PBS-leche descremada al 4% y se incubó durante 1 hora a 22°C. Luego de varios lavados se añadió un anticuerpo monoclonal específico (9E10) contra el péptido derivado del *c-myc* que contiene esta proteína (1 μ g/mL), seguido por anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La unión del fragmento al antígeno en la fase sólida se reveló y midió como se describe en otros ejemplos. Se empleó como control negativo un scFv anti-HBsAg no relacionado, obtenido y purificado de manera semejante a la descrita. En la Tabla 6 se observa que el scFv 2H1 mantiene el reconocimiento específico descrito para el scFv de fago (2H1-F) que le dió origen. La Tabla muestra la capacidad de reconocimiento del fragmento por los diferentes VEGF-A, en términos de la Densidad Óptica (a 492 nm) promedio

de tres pozos obtenida en el experimento, tomándose como referencia aquella producida por el control negativo.

Tabla 6. Reconocimiento de diferentes isoformas de VEGF-A humano y de VEGF-A de ratón por el fragmento scFv 2H1.

Fragmento	Isoforma 121 VEGF-A humano	Isoforma 165 VEGF-A humano	Isoforma 120 VEGF-A ratón
scFv 2H1 (20 µg/mL)	1,193	1,199	0,110
scFv 2H1(2 µg/mL)	1,162	1,087	0,091
scFv 2H1(0,2µg/mL)	0,753	0,612	0,086
scFv anti-HBsAg (20µg/mL)	0,091	0,095	0,082

5 (e) ELISA de competencia entre una forma soluble del receptor de VEGF (KDR-Fc) y el scFv 2H1, por el VEGF-A

Se evaluó mediante un ELISA de competencia, la capacidad del scFv 2H1 purificado para bloquear el acceso de un receptor soluble de VEGF al antígeno. El ensayo se basa en la inhibición de la unión de un receptor soluble KDR-Fc al VEGF-A humano adsorbido a una superficie sólida, mediante la adición de concentraciones crecientes de scFv 2H1. Para ello se recubrieron inmunoplaacas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) con isoforma 121 de VEGF-A humano (Peprotech) a una concentración de 1µg/mL en PBS durante 16 horas a 4°C. Las placas se bloquearon y posteriormente los pozos se incubaron con concentraciones crecientes de scFv 2H1 purificado, y 0,5 µg/mL de receptor soluble (KDR-Fc, SIGMA), o sólo con el vehículo (PBS-leche al 4%). Se empleó como control negativo un scFv anti-HBsAg. El KDR-Fc unido al VEGF-A humano en la fase sólida se detectó con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa (Sigma). Como se muestra en la Figura 5, el scFv 2H1 es capaz de afectar la unión del receptor soluble al VEGF-A humano en la fase sólida, con una clara dependencia de la dosis utilizada.

20 (f) Comparación inmunquímica entre el scFv 2H1 y el Avastin

Se comparó el fragmento bacteriano scFv 2H1 con Bevacizumab (Avastin®, Genentech) con respecto a su capacidad de identificación de la proteína de fusión

P64_{47aa}-VEGF, originalmente usada para el procedimiento de selección de anticuerpos en fagos descrito en el Ejemplo 3 y que dio origen al scFv 2H1-F. Se inmovilizaron P64_{47aa}-VEGF o VEGF-A humano (Peprotech) en inmunoplasacas Maxisorp (Nunc) de 96 pocillos a una concentración 1 µg/ml in PBS, durante 16h a 4°C. La placa se bloqueó a 22°C con PBS-leche al 4% durante 1 h. Se incubaron diluciones seriadas de scFv 2H1 o Bevacizumab en PBS-leche al 4% por 1h, se lavaron las placas, y se realizó otra incubación como sigue: (i) para el scFv 2H1, con el anticuerpo monoclonal anti *c-myc* 9E10, seguido de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma), y (ii) para el Bevacizumab, con anticuerpos de cabra anti-IgG humana, conjugados con peroxidasa (Sigma). Las reacciones se revelaron con una solución sustrato compuesta de *orto*-fenilendiamina 0,5 mg/mL y peróxido de hidrógeno 0,015%, en tampón citrato pH 5,5. Como se ve en la Tabla 6a, que presenta las absorbancias promedio a 492 nm obtenidas en un lector de ELISA, con 3 pozos réplicas por muestra estudiada, el scFv 2H1 reconoce tanto P64_{47aa}-VEGF como el VEGF-A humano, mientras que el Bevacizumab sólo reconoce el VEGF-A humano de Peprotech. Las moléculas no relacionadas scFv anti-HBsAg y TheraCIM (anticuerpo humanizado IgG1 contra el receptor de EGF; CIMAB SA, Habana) se usaron como controles negativos.

Tabla 6a. Inmunoreactividad del fragmento scFv 2H1 y el Bevacizumab contra P64_{47aa}-VEGF y la isoforma 121 del VEGF-A humano.

Molécula relacionada a anticuerpos	Isoforma 121 de VEGF-A humano	P64 _{47aa} -VEGF
scFv 2H1 (20 µg/mL)	1,880	1,678
scFv 2H1(2 µg/mL)	1,480	1,113
scFv 2H1(0.2 µg/mL)	0,610	0,490
Bevacizumab (20 µg/mL)	3,201	0,145
Bevacizumab (2 µg/mL)	2,907	0,127
Bevacizumab (0.2 µg/mL)	1.885	0,110
scFv anti-HBsAg (20 µg/mL)	0,067	0,085
TheraCIM (20 µg/mL)	0,097	0,112

Ejemplo 6. Expresión del scFv 2H1 en *Pichia pastoris* y demostración de su reconocimiento para el VEGF humano.

(a) Re-amplificación del scFv y clonaje en el vector pPS9

El gen que codifica para el scFv 2H1 se digirió NcoI/XbaI a partir del pACR.1-2H1 con vistas a su clonaje en el vector de expresión pPS9 de *Pichia pastoris*. El plasmidio pPS9 es un vector integrativo que contiene un fragmento de 1,15 Kb que corresponde al promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX.1) seguido del gen que codifica para la señal de secreción de la sucrosa invertasa (sucII) de *Saccharomyces cerevisiae*, un sitio múltiple de clonaje, un fragmento de 960 pb de la enzima gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (Gapt) para garantizar la terminación de la transcripción, y el gen HIS3 de *S. cerevisiae* como marcador de selección. Además, este vector contiene un fragmento de 2.1 kb, correspondiente a la secuencia 3' del gen AOX.1. Todos estos elementos están insertados en un vector pUC18 (EP0438200 A1).

Luego de la digestión NcoI/XbaI del gen del 2H1, y purificación desde gel de agarosa esta se ligó al vector pPS9 previamente digerido NcoI/SpeI, y los productos de la ligazón se emplearon para transformar la cepa XL-1 Blue de *E. coli*. Se analizaron colonias aisladas correspondientes a la transformación de la cepa con cada vector recombinante, utilizando una RCP de colonias con un cebador que híbrida en el promotor, seleccionándose aquellas que resultaron contener el inserto. La secuenciación de los genes clonados se realizó según procedimiento descrito en otros ejemplos. Las secuencias obtenidas para los plasmidios recombinantes denominados pPS2H1-12 y pPS2H1-13 concuerdan, y contienen el scFv 2H1, con secuencia compatible a la citada en SEC ID No. 6.

Se obtuvieron cepas recombinantes de *P. pastoris* con estos dos plasmidios mediante la electroporación de la cepa salvaje MP36 his 3 (Yong V. *et al.* 1992. *Biotechnol. Applic.* 9: 55-61), previamente digeridos con la enzima de restricción PvuII (Promega), y seleccionando en medio mínimo deficiente de histidina. Producto de los diferentes mecanismos de recombinación de los plasmidios con sitios específicos en el genoma de *P. pastoris*, se lograron aislar dos tipos de fenotipos diferentes de cepas secretoras: (a) cepas cuyo gen del AOX.1 no fue afectado durante el evento de recombinación y, por consiguiente, crecieron en un medio con metanol y mostraron un crecimiento similar al de la cepa salvaje (Mut+) y (b) cepas

cuyo gen de AOX.1 fue reemplazado por el casete de expresión y manifestaron un crecimiento lento en presencia de metanol (Mut s).

(b) Estudios de expresión

Los estudios de expresión del fragmento de anticuerpo se realizaron partiendo de las colonias prototróficas His⁺ crecidas en placas con medio selectivo. Se inocularon 10 mL de medio rico tamponado en tubos de 50 mL, con las colonias en cuestión y se colocaron a 28°C con rotación de 150 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron 2 unidades de D.O a 600 nm, se centrifugó a 2000 rpm, durante 10 minutos. Los precipitados celulares se resuspendieron en 10 mL de medio rico con metanol en lugar de glicerol como fuente única de carbono. A partir de este momento y durante 96 horas se procedió a la inducción de las proteínas de interés, con la adición diaria de metanol puro hasta una concentración final de 1% en el cultivo. Como control negativo se empleó la cepa MP36his3 transformada con un vector sin inserto.

Culminado el período de cultivo las células se centrifugaron y se colectó el medio de cultivo metabolizado durante la fase de inducción, el cual se centrifugó una vez más para su clarificación final y detección del scFv 2H1 en SDS-PAGE al 15%. Este ensayo reveló la expresión, en ambos casos, de proteínas del peso molecular esperado (aprox. 29 kDa), que luego se evaluaron por Western Blot utilizando el AcM 9E10, como anticuerpo primario, y anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma). Para las dos construcciones, las proteínas recombinantes fueron identificadas por el AcM 9E10.

(c) Reconocimiento del VEGF humano por el scFv 2H1 en ELISA

Se realizó un ensayo ELISA semejante al descrito para el scFv 2H1 derivado de *E. coli*, empleando similares fase sólidas, reactivos y condiciones de recubrimiento, incubación, revelado y controles. Las muestras de cultivo metabolizado de las cepas recombinantes inducidas se añadieron diluídas en PBS-1% de leche, y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Como controles negativos se emplearon medios metabolizados correspondiente a la cepa MP36 his 3, y un scFv anti-HBsAg no relacionado. Como control positivo se empleó el scFv 2H1 purificado. Se consideraron positivos aquellos valores de absorbancia al menos 4 veces mayores que los producidos por los controles negativos. Las muestras de medios metabolizados en fase de inducción del fragmento scFv 2H1 expresado en *P.*

pastoris (denominado scFv 2H1-Pp17) resultaron positivas en cuanto a su capacidad de reconocimiento de VEGF-A humano adsorbido a una fase sólida.

Ejemplo 7. Obtención de fragmento Fab bacteriano a partir de las regiones variables del scFv 2H1 y caracterización de su reconocimiento para el VEGF humano

(a) Amplificación de las RV del scFv 2H1, clonaje en el vector pFabHum-1 y secuencia

En la Figura 6 se esquematiza el plasmidio pFabHum-1, empleado para la producción de fragmentos solubles tipo Fab en el periplasma y medio de cultivo de *E. coli*. El vector tiene un promotor LacZ, un RBS, la secuencia de un péptido señal (PS), sitios de clonaje para la región variable de cadena ligera (Sal I y Avr II), y la secuencia codificante para un dominio Cλ de inmunoglobulina humana, seguidos por otro RBS y secuencia de PS, sitios de clonaje para la región variable de cadena pesada (Apa I y Bst EII) seguidos por la secuencia codificante de un dominio CH1 de inmunoglobulina humana, extendida para incluir la primera cisteína de la región bisagra de una IgG1 humana. La proteína RV pesada-CH1 se expresa asociada a un dominio de seis histidinas para la purificación mediante IMAC y a un péptido c-myc para propósitos analíticos, ambos en el extremo C-terminal y que aporta el propio vector.

El ADN correspondiente al fagomidio que porta el scFv denominado 2H1-F se digirió primero con las enzimas Sal I y Avr II para obtener la región variable de cadena ligera. Luego de verificar la talla en gel de agarosa al 1,5% se procedió al clonaje en el pFabHum-1. Una vez verificado el clonaje mediante enzimas de restricción, el plásmido (denominado pFab-Hum-1 RVL) se replicó, purificó y sometió entonces a una nueva digestión con las enzimas Apa I y Bst EII. En el caso de la Bst EII, la digestión fue parcial. Una vez verificada la talla en gel de agarosa al 1,5% se procedió al clonaje en el pFab Hum-1 RVL. Una vez verificado el clonaje mediante enzimas de restricción, el plásmido (denominado pFab 2H1-32), se replicó, purificó y se secuenció automáticamente. La secuencia de ADN codificante para la proteína madura Fab 2H1-32 se describe en la Figura 7. La correspondiente a la combinación RV de cadena ligera y Cλ se puede ver en 7A (SEC ID No.9) y la correspondiente a la combinación RV de cadena pesada y CH1 se puede ver en 7B

(SEC ID No.10). Aparecen subrayadas en la Figura las secuencias de las CDR, anotadas según la clasificación de Kabat *et al.*

(b) Expresión del Fab en *E. coli*

Se empleó el pFabHum-1H1-32 para transformar células competentes BL21 de *E. coli*. La transformación se plaqueó en medio sólido selectivo y se permitió el crecimiento a 37°C por 16 horas. Una colonia representativa de la construcción se creció en medio líquido y al alcanzar 1 de DO_{530nm} se indujo por 12 horas añadiendo 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Las células se centrifugaron y el contenido periplasmático se aisló mediante shock osmótico y sonicación breve, tanto la fracción periplasmática, como el sobrenadante de cultivo se evaluaron en SDS-PAGE al 12%. Este ensayo reveló la expresión de una proteína de peso molecular esperado (aprox. 50 kDa), que luego se evaluó por Western Blot utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal específico contra el péptido derivado del *c-myc* (9E10), seguido por anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma). El Western blot demostró que el AcM 9E10 detectó una proteína de la talla esperada, distribuida tanto en el sobrenadante de cultivo como en el periplasma bacteriano.

(c) Purificación del Fab 2H1-32 mediante IMAC y caracterización del reconocimiento de VEGF por ELISA

Las bacterias recombinantes transformadas con el vector pFabHum-1H1-32 se centrifugaron y el sobrenadante se dializó por 72 horas en el tampón de acomplamiento. Las preparaciones conteniendo el Fab se aplicaron directamente a una matriz de Agarose-NTA (QIAGEN). Después de eliminar los contaminantes de *E. coli* mediante lavados, el Fab 2H1-32 se obtiene en la fracción eluida con un pureza de alrededor del 85%, estimada por SDS-PAGE al 12%.

El fragmento Fab purificado se evaluó para su capacidad de reconocimiento de VEGF humano mediante un ensayo de ELISA. Para ello se recubrieron inmunoplaacas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) con las isoformas 121 y 165 de VEGF-A humano (Peprotech) y la isoforma 120 de VEGF-A de ratón (R&D) a una concentración de 1 µg/ml. Las muestras del Fab purificado se diluyeron y se incubaron una hora a 22°C. Luego de varios lavados se añadió un anticuerpo monoclonal específico (9E10) contra el péptido derivado del *c-myc* (1 µg/mL),

seguido por anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma). Se empleó como control negativo un scFv anti-HBsAg y como positivo el scFv 2H1 purificado. Como muestra la Tabla 7 se demostró que el Fab producido en *E. coli* reconoce de forma específica el VEGF humano por ELISA. La Tabla

5 muestra la capacidad de reconocimiento del fragmento Fab 2H1-32 por los diferentes VEGF-A, en términos de la Densidad Óptica (a 492 nm) promedio de tres pozos obtenida en el experimento, tomándose como referencia aquella producida por el control negativo.

10 **Tabla 7. Reconocimiento de diferentes isoformas de VEGF-A humano y de VEGF-A de ratón por el fragmento Fab 2H1-32.**

Fragmento	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Isoforma 165 de VEGF-A humano	Isoforma 120 de VEGF-A de ratón
Fab 2H1-32 (20 µg/mL)	1,020	1,101	0,089
Fab 2H1-32 (2 µg/mL)	1,087	1,065	0,090
Fab 2H1-32 (0,2µg/mL)	0,675	0,645	0,070
scFv anti-HBsAg (20µg/mL)	0,087	0,078	0,083
scFv 2H1 (2 µg/mL)	1,098	1,076	0,082

Ejemplo 8. Obtención y caracterización del reconocimiento de moléculas diméricas que comprenden dos unidades del fragmento scFv fusionadas genéticamente al fragmento Fc de una IgG1 humana.

15

(a) Obtención de transfectomas productores de moléculas scFv₂-Fc anti-VEGF

Para obtener moléculas tipo "anticuerpo completo" con dos sitios de unión semejantes al definido por el scFv 2H1, se realizó una RCP utilizando como molde el plásmidio pACR.1-scFv 2H1 que contiene la secuencia génica del scFv 2H1 y los

20 cebadores # 5 (SEC ID No. 10) y # 6 (SEC ID No.11) que aparecen en la Tabla 8,

para modificar la secuencia de ADN que codifica para este fragmento de anticuerpo y hacerla compatible con el clonaje que sigue. Este procedimiento se realizó con la enzima PanoTaq (Panorama Inc.), y el procedimiento recomendado por el fabricante.

5 **Tabla 8. Cebadores empleados en la RCP del pACR.1-scFv 2H1 para su clonaje en pVSJG-HucFc.**

Oligonucleótido	Secuencia
#5 (SEC ID No. 11)	5'... ACAGGGCTTAAGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG... 3'
#6 (SEC ID No. 12)	5'... TGTTGTTCTAGAACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC... 3'

El ADN amplificado se clonó en el vector pVSJG-HucFc. Este vector se representa en la Figura 8A y fue diseñado para la expresión en células de mamífero de una

10 cadena polipeptídica que comprenda, en este orden: una secuencia líder (péptido señal) de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal murino, seguida de un fragmento scFv, separado por 10 aminoácidos (que actúan como espaciador) de las secuencias consenso que forman los dominios bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina IgG1 humana. Gracias a la secuencia líder, esta cadena pasa al

15 retículo endoplásmico, donde se dimeriza a partir de la formación de los enlaces covalentes disulfuros en el dominio bisagra y la asociación complementaria de las regiones CH2 y CH3. Los dominios bisagra, CH2 y CH3 forman así un Fc de inmunoglobulina humana, al cual están asociados por su extremo N-terminal dos scFv idénticos que la convierten en una molécula bivalente tipo "anticuerpo

20 completo" (Figura 8B). Entre las características principales de este vector están la presencia de un promotor de Citomegalovirus.

La banda correspondiente al producto de la amplificación se digirió con las enzimas Afl II y Xba I y se clonó en el vector pVSJG-HucFc, previamente digerido con estas mismas enzimas. De las colonias bacterianas resultantes de la transformación con

esta preparación plasmídica recombinante se seleccionaron dos para secuencia. La secuencia automática detectó que las dos colonias producían plásmidos recombinantes casi idénticos, que se denominaron scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2, cuya única diferencia entre sí estaba en que el primero de estos tiene una base de la RV de cadena pesada diferente, que es silente respecto al aminoácido que codifica, y tres bases diferentes en la RV de la cadena ligera, todo respecto a las RV (SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8) del scFv 2H1. Las secuencias que codifican para las proteínas maduras resultantes aparecen en las Figura 9 (SEC ID No. 13) y Figura 10 (SEC ID No. 14), respectivamente. Aparecen subrayadas en la Figura las secuencias de las CDR, anotadas según la clasificación de Kabat *et al.*

Los dos plásmidos se purificaron en condiciones libres de endotoxina utilizando el sistema de Pure Yield Plasmid Midiprep (Promega), y se emplearon para transfectar células del mieloma P3/x63.Ag8.653 utilizando el reactivo SuperFect (QIAGEN). Los transfectomas se seleccionaron en presencia del marcador de selección G418. Los sobrenadantes obtenidos a partir de las colonias de transfectomas resistentes a este antibiótico se evaluaron mediante un ensayo de ELISA. Para ello se recubrieron inmunoplaacas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) con la isoforma 121 del VEGF humano (Peprotech). Los sobrenadantes de las colonias de transfectomas diluidos en PBS-leche al 2% se adicionaron a las placas y la presencia de moléculas tipo scFv₂-Fc anti-VEGF se detectó con anticuerpos anti-Fc humano conjugado a peroxidasa (Sigma). Las colonias de células transfectomas que secretaron mayores cantidades de moléculas scFv₂-Fc anti-VEGF humano detectadas por ELISA se clonaron repetidamente por dilución limitante, en presencia de G418 y siempre evaluando su capacidad productora mediante ELISA. Después de dos clonajes consecutivos se obtuvieron dos clones estables independientes, productores del scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2.

(b) Purificación de las moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 y evaluación de su capacidad de reconocimiento de VEGF humano por ELISA

Los clones de transfectoma productores de las moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 se cultivaron en frascos de 162 cm² en presencia de 10% de suero fetal bovino y se colectó el sobrenadante a partir de alcanzada una alta densidad celular. Los sobrenadantes de los dos clones se diluyeron 1:1 en tampón fosfato de sodio

0,1 M, pH 7,0 y se purificaron de forma independiente mediante cromatografía de afinidad, empleando matrices de Proteína A Sepharosa Fast Flow 4 (Amersham). Las moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 se eluyeron con tampón Glicina 0,2 M; pH 4,0 y sometieron a una rápida neutralización con Tris 1 M; pH 10,0. Luego de diálisis contra PBS, se estimó la concentración mediante adsorbancia UV a 280 nm y la pureza por SDS-PAGE al 12%. Se determinó que la preparación tenía más de un 85% de pureza. Muestras de las moléculas purificadas se aplicaron a un sistema ELISA como el descrito en el procedimiento anterior, en comparación con sobrenadante sin purificar, determinándose que las mismas poseían una adecuada actividad de reconocimiento de VEGF-A humano por este método.

Ejemplo 9. Identificación del epítipo del VEGF humano reconocido por el scFv 2H1

(a) Selección de péptidos reconocidos por el scFv 2H1 a partir de bibliotecas combinatorias de péptidos en fagos filamentosos

Para la identificación del epítipo reconocido por el scFv 2H1 en el VEGF-A humano se siguió la estrategia de enfrentar el scFv 2H1 a una biblioteca combinatoria de péptidos lineales de 12 aminoácidos, desplegada en la superficie de fagos filamentosos (Combinatoria Molecular. Santiago Vispo, N. (Ed.) Elfos Scientiae, 2004, La Habana.). La mezcla de fagos que conforman la biblioteca, diluida en PBS-leche descremada al 4%, se enfrentó al scFv 2H1 purificado de bacterias inmovilizado en inmunotubos (Nunc, Maxisorp). Para ello, los tubos se recubrieron con scFv, y luego se bloquearon con PBS-leche descremada al 4%. Los fagos que no se unieron al scFv en los inmunotubos se eliminaron mediante 20 lavados con una solución de PBS-Tween al 0,1% y 2 lavados con PBS. Los fagos unidos se eluyeron con una solución de 100 mmol/L de trietilamina que fue inmediatamente neutralizada con 0,5 mol/L de Tris (pH 7,5). Los fagos eluidos se amplificaron en bacterias TG1 y se usaron como material de partida en el próximo ciclo de selección. Este procedimiento se repitió 3 veces bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se seleccionaron al azar colonias individuales de TG1 infectadas con los fagos eluidos del segundo y tercer ciclo de selección para producir fagos a escala de 96 pozos.

La capacidad de unión de estos clones de fagos que portan péptidos al scFv 2H1 se evaluó mediante un ELISA de fagos. En este ELISA se recubrieron placas de 96

pozos Maxisorp (Nunc) con scFv 2H1, y luego se bloquearon. Los fagos diluidos en PBS-leche descremada al 4% se incubaron durante 1 hora a 22°C en las placas, seguido por varios lavados con PBS-Tween al 0,1%. Los fagos unidos se detectaron mediante la adición de un conjugado anti-M13 peroxidasa (Amersham). De los 40 clones de fagos evaluados mediante este ELISA, 35 de ellos resultaron positivos y se emplearon para el procedimiento que aparece a continuación.

(b) ELISA de competencia por la unión al scFv 2H1

Para comprobar que los 35 clones de péptidos en fagos seleccionados reconocen específicamente al sitio de unión del scFv 2H1, se realizó un ELISA donde se evaluó la competencia de los péptidos en fagos con el VEGF-A, por la unión al fragmento scFv adsorbido a una superficie sólida. Para ello se recubrió una placa de 96 pozos (Nunc, Maxisorp) con 10 µg del scFv 2H1, y se bloqueó. La mitad de los pozos de la placa se incubaron con 10 µg /mL de VEGF (Peprotech) en PBS-leche descremada al 4%, y luego de varios lavados con PBS-Tween al 0,1%, se añadieron los fagos diluidos en PBS-leche descremada al 4%, conteniendo 10 µg /mL de VEGF (Peprotech), que se incubaron en condiciones semejantes a las descritas. Simultáneamente, la otra mitad de los pozos de la placa se incubaron con PBS-leche descremada y luego de varios lavados con PBS-Tween al 0,1%, se añadieron los fagos diluidos en PBS-leche descremada al 4%. Los fagos unidos se detectaron mediante la adición de un conjugado anti-M13 peroxidasa (Amersham). Como se ve en la Figura 11 para una muestra de los clones ensayados, la presencia de VEGF impide completamente la unión de los péptidos asociados a fago al scFv 2H1 inmovilizado.

(c) Secuenciación de los péptidos obtenidos de las bibliotecas

De una muestra de 20 de los 35 clones de péptidos caracterizados en el procedimiento anterior se obtuvo ADN de fagemido y se sometió a secuenciación automática. Las secuencias obtenidas para los 20 clones estudiados ofrecieron resultados idénticas, siendo esta: CCRTLMLLQYHR (SEC ID No 15).

(d) Estudio predictivo del epítipo reconocido por el scFv 2H1

La secuencia definida en el procedimiento anterior se analizó mediante los programas FINDEPI (<http://www.biocomp.cigb.edu.cu/findepi>) y 3D Epitope Explorer (Schreiber A. J. 2005. Comput Chem 26: 879-887), con resultados semejantes.

Estos son métodos computacionales que predicen parches proteicos de superficie implicados en las interacciones proteína-proteína. Como datos de entrada, los métodos precisan de la estructura 3D de un elemento de la pareja de interacción (proteína molde; en nuestro caso el VEGF-A humano, a partir del Banco de Datos de Proteínas PDB (Código 1BJ1) y la secuencia aminoacídica del segundo elemento en esta interacción (proteína de unión; en nuestro caso el péptido CCRTLMLLQYHR; SEC ID No. 15). A manera de ejemplo, el programa FINDEPI genera una base de datos de mimotopos potenciales de cada parche de superficie en la proteína molde, aplicando un conjunto de reglas estereoquímicas. Esta base de datos se explora usando métodos de alineamiento de perfiles para detectar mimotopos potencialmente similares a los péptidos seleccionados experimentalmente por su unión. Luego de aplicar un algoritmo de agrupamiento, el programa reporta una lista de residuos expuestos en la superficie de la proteína molde, con posibilidad de estar localizados en la interfase de interacción entre las dos proteínas. La certeza del método se ha ensayado con complejos proteína-proteína para los cuales se conoce su estructura cristalográfica, y para los que hay datos experimentales de secuencia de los péptidos que se unen.

Con ambos programas se definió una zona de interacción en la molécula de VEGF-A humano que comprende principalmente los residuos C102, C57, R56, T31 y L32 (anotados según el Banco de Datos de Proteínas PDB Código 1BJ1). Se considera en esta invención que estos residuos son indicadores principales del epítipo reconocido por el scFv 2H1. De acuerdo a las predicciones realizadas pudieran aparecer también asociados a los residuos indicadores principales del epítipo descritos arriba, aunque con una puntuación menor, los residuos G59, C68, V69, P70 y H99. El epítipo definido principalmente a través de los residuos C102, C57, R56, T31 y L32 no coincide con aquellos reportados para otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan el VEGF humano (Muller AY *et al.* 1997. PNAS 94: 7192-7197; Muller AY. *et al.* 1998. Structure 6: 1153-1167; Schaeppi J.-M. *et al.* 1999. J Cancer Res Clin Oncol 125: 336-342; Fuh G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631; WO2005012359). El epítipo definido principalmente a través de los residuos C102, C57, R56, T31 y L32 puede estar relacionado con la conservación de la estructura dimérica del VEGF-A, si tenemos en consideración los experimentos descritos en el Ejemplo 4 que indican la pérdida de reconocimiento del

scFv 2H1 por su antígeno cuando este último se somete a una reducción de los puentes disulfuro, que separa el dímero en monómeros.

La Figura 12 muestra el mapeo de los residuos que definen principalmente el epítipo reconocido en la molécula del VEGF-A por el scFv 2H1, en comparación con aquellos descritos para otros anticuerpos. Para ello se emplea un diagrama representativo tipo *cartoon* de la estructura terciaria del VEGF-A humano en su conformación dimérica, con hélices alfa, cadenas beta y lazos. Las dos moléculas idénticas del dímero aparecen como gris claro y negro. Para simplificar, la posición de los residuos definidos como indicativos principales del epítipo reconocido por el scFv 2H1 se marcan sólo en la cadena gris claro, y aparecen en negro, en representación Van der Waals (VDW). Los residuos reconocidos por otros anticuerpos se marcan como VDW gris claro en las Figuras 12 A a la D. Las Figuras 12A y 12B muestran que el epítipo definido por los residuos indicativos principales para el scFv 2H1 es contiguo pero no solapado con aquel definido para los Fab G6 y B20-4 (Fuh G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631). La Figura 12C muestra que el epítipo definido por los residuos indicativos principales para el scFv 2H1 es bien diferente y alejado estructuralmente con aquel definido para el anticuerpo humanizado Bevacizumab, conocido comercialmente como Avastin. La Figura 12D muestra que el epítipo definido por los residuos indicativos principales para el scFv 2H1 tampoco se solapa estructuralmente con aquel definido para el anticuerpo 3.2E3.1.1 (Muller AY *et al.* 1997. PNAS 94: 7192-7197).

En la Figura 12E se muestra la posición de aminoácidos contiguos (en VDW gris claro) que son diferentes cuando se comparan las secuencias del VEGF-A humano y de ratón, en relación con la posición del epítipo definido por los residuos indicativos principales C102, C57, R56, T31 y L32 para el scFv 2H1 (en VDW negro). Es conocido en el estado del arte que los residuos contiguos a un epítipo dado son críticos para la proyección de la estructura terciaria del mismo, y por tanto, para su reconocimiento por anticuerpos, así como que el cambio de un solo aminoácido es suficiente para determinar la especificidad de un anticuerpo por una molécula de una especie u otra (Fuh G. *et al.* 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631). Ello pudiera explicar porqué el scFv 2H1 no reconoce el VEGF-A de ratón.

Todos estos elementos indican que el sitio de unión al antígeno definido por las RV que componen el scFv 2H1 es diferente a los de otros anticuerpos y fragmentos que

neutralizan el VEGF humano reportados en la literatura, no sólo en cuanto a su secuencia de aminoácidos, sino también en lo que respecta al epítipo reconocido en el antígeno y, por tanto, en su probable mecanismo de interferencia con las funciones biológicas del VEGF humano nativo.

5 **Ejemplo 10. Evaluación del efecto anti-proliferativo *in vitro* de diferentes moléculas que reconocen el VEGF humano, en el modelo de células endoteliales humanas de cordón umbilical, estimuladas con VEGF humano.**

Se evaluó el efecto antiproliferativo *in vitro* de las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 en el modelo de células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HuVEC) estimuladas con VEGF humano. Brevemente, se sembraron 3 000 células HuVEC (PromoCell GmbH) por pozo en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Costar), previamente recubiertas con Gelatina (Sigma) al 1%, en medio RPMI 1640 suplementado con 1% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco) y se crecieron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Las células se estimularon con medio fresco suplementado con 10 ng/ml de VEGF-A humano (Peprotech) y se incubaron con diferentes concentraciones de las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2.

Las células HuVEC se crecieron en presencia de 10 ng/mL de VEGF-A humano, donde alcanzan una proliferación que se define arbitrariamente como 100% (controles de proliferación sin interferencia, barra VEGF), o se les añadieron mezclas de las moléculas purificadas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2, a tres concentraciones diferentes (barra rayada: 2 µg/mL; barra completa: 1 µg/mL y barra vacía: 0,5 µg/mL) con 10 ng/mL de VEGF-A humano (Peprotech). Se usó como control de inhibición la mezcla con el receptor soluble KDR-Fc a 0,5 µg/mL. Como control negativo se empleó un scFv anti-HBsAg en la mezcla. Después de 72 horas de incubación las células se tiñieron con 0,5% de violeta cristal en 20% de metanol. Las placas se lavaron con agua y se dejaron secar al aire. La tinción se eluyó con una solución 1:1 de etanol en 0,1M de citrato de sodio y se midió la absorbancia en un lector de placas a 562 nm. El valor de la absorbancia de la proliferación celular basal fue sustraída a todos los valores de la placa y los datos fueron representados como el porcentaje de inhibición respecto al control de máxima proliferación. Como se muestra en la Figura 13 las moléculas

scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2 provocan una inhibición de la proliferación de las células HuVEC, que es dependiente de dosis y que puede llegar a ser de entre 45 y 58%.

Ejemplo 11. Evaluación del efecto antiangiogénico *in vivo* de diferentes moléculas que reconocen el VEGF humano, en el modelo del pellet de Matrigel subcutáneo en el ratón.

Se evaluó el efecto antiangiogénico *in vivo* de las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 en el modelo descrito por Passaniti y colaboradores (Passaniti A *et al.* 1992. Lab Invest. 67:519-28). En este modelo se induce la angiogénesis mediante una inoculación subcutánea de ratones C57Bl/6 con un extracto de proteínas de la matriz extracelular (Matrigel, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) en presencia de factores pro-angiogénicos. Los animales se dividieron en grupos de 10 y se inyectaron por vía subcutánea en la línea media abdominal con 500 µL de Matrigel conteniendo 100 ng de VEGF humano (Peprotech), y diferentes concentraciones de las moléculas a ensayar o de un anticuerpo no relacionado (CB-Hep.1, Heber Biotec, Habana). A los seis días, los animales se sacrificaron y se les extrajo el tapón de Matrigel, a partir del cual se determinó el contenido de hemoglobina por el Método de Drabkin utilizando el sistema Drabkin's reagent kit (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 inhiben de manera significativa ($p < 0,001$) la vascularización inducida por el VEGF humano en los pellet de Matrigel, lo cual se correlacionó con una disminución de los niveles de hemoglobina.

Ejemplo 12. Evaluación del efecto antiangiogénico *in vivo* de diferentes moléculas que reconocen el VEGF humano, en el modelo de ratones desnudos xenotrasplantados con células tumorales humanas de la línea A431.

Debido a que la angiogénesis inducida por el tumor y por algunas de las células del estroma tumoral es imprescindible para el crecimiento y la diseminación de los mismos, y esta angiogénesis está principalmente mediada el VEGF producido por estos elementos celulares, un modelo efectivo para el ensayo de sustancias anti-angiogénicas es aquel de la inhibición del crecimiento tumoral en animales. Debido

a que el scFv 2H1, y por tanto las moléculas derivadas de las RV que lo componen, identifican solamente VEGF humano, el modelo de crecimiento tumoral en ratones fue establecido con células tumorales humanas inoculadas a ratones atímicos congénitos (ratones desnudos; nu/nu). En el experimento realizado se emplearon 9 grupos de 5 ratones atímicos nu/nu de estirpe BALB/c (CENPALAB, Habana), con edades de entre 8 y 10 semanas. Los grupos de tratamiento se organizaron para cada una de las cuatro moléculas (scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2) teniendo en consideración dos niveles de dosis: 25 mg/kg y 2,5 mg/kg por ratón en PBS pH 7,2. El noveno grupo (control negativo) fue tratado sólo con el vehículo (PBS pH 7,2). Los ratones se inocularon por vía subcutánea con 5x10⁶ células tumorales humanas de la línea A431 (ATCC, CRL 1555) en la zona dorsal derecha. Cuando los tumores alcanzaron volúmenes de 200 mm³ los ratones se aleatorizaron en los 9 grupos de 5 animales y se comenzó el tratamiento según lo indicado para cada grupo experimental. Las administraciones se realizaron por vía intraperitoneal, en un volumen de 200 µL totales, cada 2 días durante 3 semanas. El control fue inoculado con el anticuerpo monoclonal murino no relacionado CB-Hep.1 a la dosis mayor. Se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral con mediciones de los diámetros mayor (largo) y menor (ancho) de los tumores, usando un calibrador digital. Los volúmenes tumorales se calcularon como: volumen tumoral (mm³) = 0.52 × largo (mm) × ancho² (mm). Se compararon los volúmenes tumorales para todos los grupos a lo largo del periodo de observación mencionado, empleando como estadígrafo un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En ese momento, los animales se sacrificaron y los tumores se removieron quirúrgicamente y analizaron por histopatología mediante tinción con Hematoxilina y Eosina.

Como demuestra la Figura 14, todos los ratones inoculados con scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2 manifestaron una reducción estadísticamente significativa del volumen tumoral respecto al control negativo, y una marcada dependencia de dosis. De las cuatro moléculas, scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2 dieron los mejores resultados, pudiendo esto estar relacionado con el mayor tamaño de la molécula, que aumenta su biodisponibilidad, a pesar de que en términos del número de sitios de unión al antígeno inyectados, por unidad de masa, el scFv 2H1 tiene una ligera ventaja sobre los otros dos tipos de molécula. Las diferencias encontradas entre el Fab y el scFv 2 H1 no fueron estadísticamente

significativas, aún cuando la diferencia en masa es casi del doble, a favor del Fab. Esto puede deberse a que, en el caso de anticuerpos cuyo efecto se basa en neutralizar moléculas solubles más que en afectar directamente a las células tumorales, la penetración tumoral (supuestamente mejor a menos tamaño) no es tan importante como la biodisponibilidad, que está favorecida para las moléculas "tipo IgG" como scFv₂-Fc 2H1 4.1 y scFv₂-Fc 2H1 8.2, por la presencia de un Fc compatible con el reciclaje mediado por el FcRn (Vaccaro C. *et al.* 2005. *Nature Biotechnol* 23:1283-1288). Para esta propiedad, el scFv y el Fab no son tan diferentes, ya que ambos carecen de Fc. Al análisis histopatológico, los tumores de los ratones tratados mostraron una reducción significativa de la densidad vascular, una reducción del diámetro de los vasos, un aumento de la apoptosis tumoral y reducción de las figuras mitóticas.

Ejemplo 13. Capacidad del fragmento scFv 2H1 marcado con ¹²⁵I para alojarse selectivamente en la zona del tumor en ratones desnudos inoculados con células A431.

Para la determinación de la capacidad del fragmento scFv 2H1 de alojarse en la zona correspondiente al crecimiento tumoral de las células A431, este fragmento, y un fragmento de anticuerpo scFv murino anti-antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv-Hep.1) se marcaron con ¹²⁵I (Amersham, UK) mediante el método de Iodogen (Fraker PJ, Speck JC Jr. 1978. *Biochem Biophys Res Comm* 80:849-857) para actividades específicas de 1,3 MBq/5 µg y 1,28 MBq/5 µg, respectivamente.

Los productos radiomarcados se analizaron en cromatografía de capa delgada para determinar la incorporación a proteína, encontrándose valores de 93 y 95% de la radiactividad, respectivamente. La capacidad de los productos radiomarcados para detectar sus antígenos correspondientes (VEGF humano y HBsAg) se ensayó en un sistema donde se recubrieron inmunotubos de poliestireno con la isoforma 121 de VEGF humano recombinante (5 µg/mL; Peprotech), o HBsAg recombinante (5 µg/mL; Heber Biotec, Habana), se bloquearon, y se les añadió la muestra del fragmento radiomarcado de especificidad correspondiente, ajustada a las cantidades que podían ser atrapadas por esa fase sólida. Luego de la incubación y el lavado se determinó que la fase sólida era capaz de unir el 84% y el 82% de la radiactividad, para el scFv 2H1 y el scFv-Hep.1, respectivamente, demostrando que

el procedimiento de radiomarcaje no afectó sensiblemente la actividad biológica de los fragmentos.

Para estudiar la biodistribución se usaron 20 ratones nu/nu. Los animales se inocularon por vía subcutánea con 5×10^6 células tumorales humanas de la línea A431 en la zona dorsal derecha. Cuando los tumores alcanzaron volúmenes de alrededor de 300 mm^3 se aleatorizaron cuatro grupos de 5 animales y comenzó el tratamiento. Los ratones se inyectaron por la vena de la cola con el producto radiomarcado en cuestión (10 con scFv 2H1 y otros 10 con scFv Hep.1), y se sacrificaron en grupos de 5 de cada producto a las 24 y 48 horas, removiéndose quirúrgicamente el tumor y los siguientes tejidos normales: bazo, hígado, riñón, intestino, músculo, médula y sangre. La acumulación de radiactividad se expresó como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido. La calibración se realizó mediante una muestra estándar de la dosis inyectada. La radiactividad se determinó empleando un contador de centelleo gamma.

La Figura 15 muestra los porcentos de radiactividad recuperada por tejido estudiado, a los diferentes tiempos, respecto a la radiactividad total inyectada. Junto a los resultados resumidos en la Tabla 9 para el caso específico de la relación de los valores radiactividad en tumor:radiactividad en sangre, el experimento demuestra que entre las 24 y 48 horas el scFv 2H1 se mantiene localizado preferentemente en el tejido tumoral, no así para el scFv Hep.1 inespecífico.

Tabla 9. Relación radiactividad en tumor:radiactividad en sangre para ratones desnudos trasplantados con las células humanas tumorales A431, que expresan VEGF humano.

Molécula	24 horas	48 horas
scFv 2H1	33,3	30,0
scFv-Hep.1	0,4	1,0

Estos resultados sugieren que el scFv 2H1 puede localizar, de forma específica, zonas anatómicas donde existe una alta concentración local de VEGF humano, tales como un tumor A431, y por lo tanto es útil para transportar a esta zona de

forma específica diferentes productos terapéuticos, tales como un isótopo radiactivo, o eventualmente una toxina o una droga. Los valores corresponden luego de 24 y 48 horas de inyectados los animales con las diferentes moléculas radiomarcadas con ^{125}I . Cada relación se calculó a partir de los valores medios derivados de los tejidos recuperados de 5 ratones.

EJEMPLO 14. Prevención de la neovascularización coroidea (NVC) experimental en primates no humanos mediante el fragmento scFv 2H1 y la molécula bivalente scFv₂-Fc 2H1-4.1.

Como modelo de neovascularización coroidea experimental se empleó el reportado por Krzystolik y colaboradores (Krzystolik M.G., *et al.* 2006. *Acta Ophthalmol*, 120:338-346). Se utilizaron 6 monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*, CENPALAB, Habana), mantenidos y manipulados de acuerdo con las guías de Buenas Prácticas con Animales de Laboratorio vigentes en la institución. Los animales se anestesiaron para todos los procedimientos con inyecciones intramusculares de hidroclicrato de ketamina; maleato de acepromazina y sulfato de atropina. También se empleó la anestesia tópica de hidroclicrato de proparacaina. La anestesia antes la enucleación y para la eutanasia se hizo con pentobarbital sódico intravenoso. Las membranas de NVC se indujeron en la mácula mediante quemaduras con laser de argón, asegurándose que el procedimiento provocaba una ampolla y una pequeña hemorragia, con puntos de aplicación de entre 50 y 100 μm . Se usaron la fotografía y la angiografía fluorescente para detectar y medir la extensión y características de las lesiones. Se chequearon los ojos de los animales a diferentes días, antes y después de la aplicación del fragmento y del placebo, del procedimiento de quemadura mediante laser, y al final del experimento, que terminó con la enucleación y muerte.

Los animales se dividieron en dos grupos de 3, según la molécula a estudiar: el fragmento de anticuerpo scFv 2H1 o la molécula bivalente tipo inmunoglobulina scFv₂-Fc 2H1-4.1. El ojo derecho de cada animal recibió 500 μg de scFv 2H1 o de scFv₂-Fc 2H1-4.1, según el grupo, en 50 μL de PBS mediante inyección intravítrea, mientras que el izquierdo sólo el vehículo. Los ojos recibieron 2 inyecciones antes del tratamiento con láser (días 0 y 14). En el día 21, todos los ojos recibieron el tratamiento con láser para la inducción de NVC. Se repitió una inyección en cada ojo en el día 2 con el producto específico o el vehículo. Tres semanas después de la

inducción por láser (día 42), los animales recibieron inyecciones intravítreas, esta vez todas de fragmento scFv 2H1 o scFv₂-Fc 2H1-4.1, según el grupo, para terminar con una última inyección semejante el día 56.

En la fase I del tratamiento (antes del día 42) los estudios demostraron una reducción en el advenimiento de lesiones grado 4 en los ojos donde se administró el scFv 2H1 o el scFv₂-Fc 2H1-4.1, en comparación con los respectivos ojos control, lo que sugiere que el fragmento ayuda en la prevención de la NVC. En la fase II del tratamiento, cuando todos los ojos recibieron fragmento scFv 2H1 o el scFv₂-Fc 2H1-4.1, se vió una reducción de las lesiones grado 4, lo que sugiere que el fragmento y la molécula bivalente son también beneficiosos para lesiones establecidas.

EJEMPLO 15. Expresión de moléculas diméricas que comprenden dos unidades del fragmento scFv fusionadas genéticamente al Fc de una IgG1 humana en plantas transgénicas de tabaco.

Se empleó la RCP, en condiciones tales como las descritas en el Ejemplo 8, para amplificar el gen que codifica para scFv₂-Fc 2H1-4.1, y modificar sus extremos para la adición de sitios de restricción apropiados (NcoI and XbaI) para clonar en vectores de células de plantas. Los oligonucleótidos sintéticos básicos empleados en la RCP se diseñaron sobre la base de las secuencias reportadas en SEQ ID No. 13. El fragmento de ADN amplificado se detectó como una banda mayoritaria de aproximadamente 1,4 Kb y se purificó desde un gel de agarosa al 1% (Sigma) empleando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, GmbH). El ADN se digirió posteriormente con las enzimas anteriormente mencionadas y se clonó en el vector pHES74 (López A., *et al.* 1996. *Biotechnología Aplicada* 13: 265-270) como una construcción scFv-bisagra-CH2-CH3 precedida de la secuencia señal de la esporamina del boniato. Este vector tiene el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S, una región líder omega del virus del mosaico del tabaco que actúa como aumentador traduccional para incrementar la cantidad de proteína producida, y el terminador nopalina sintasa que también promueve la expresión alta de genes foráneos en plantas transgénicas. El "cassette" de expresión promotor-gen de scFv-Fc-terminador se introdujo en el vector binario pDE1001, para producir el plasmidio final pDEscFv-Fc.70. Los detalles para construcciones similares y para el

trabajo con este tipo de material se han reportado previamente (Ramírez, N. *et al.* 2002. Transgenic Res. 11: 61-64).

El plasmidio final pDEscFv-Fc.70 se usó para transformar células de plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1, mediante transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas F0 y F1 se obtuvieron por procedimientos convencionales descritos anteriormente y la expresión de moléculas scFv-Fc activas se detectó empleando un sistema ELISA similar al descrito en el Ejemplo 8.

La molécula scFv-Fc biológicamente activa se prepara en la forma de proteínas totales solubles (TSP) de plantas, que se extrajeron moliendo 0,4 g de hojas de tabaco de plantas transformadas, o controles, en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, básicamente como se ha descrito. El polvo se transfirió a un tubo de reacción, se mezcló 1:2 (peso/volumen) con tampón de extracción (61 mM Tris-HCl pH 6,9; 2% SDS; 12,5% glicerol), y se incubó en hielo por 5 minutos. El material insoluble se removió centrifugando a 13 000 rpm y la parte soluble se ensayó en ELISA a diferentes diluciones, empleando anticuerpos anti-Fc humano conjugados a fosfatasa alcalina (Sigma) para detectar la expresión. Se demostró que las TSP de las plantas transgénicas contenían moléculas capaces de reconocer el VEGF humano de la fase sólida, no así las TSP de las plantas controles.

20

25

REIVINDICACIONES**ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF).**

5

10

15

20

25

30

1. Anticuerpos recombinantes caracterizados porque comprenden regiones variables de inmunoglobulinas humanas codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, que reconocen un epítipo en el VEGF-A humano definido alrededor de, aunque no necesariamente limitado a, sus residuos C102, C57, R56, T31 y L32, e interfieren con su efecto pro-angiogénico.
2. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de la secuencia codificante para un fragmento de anticuerpo tipo Fv de cadena simple (scFv), donde las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpo de origen humano están separadas por un segmento de unión (linker).
3. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia codificante para el scFv es la SEC ID No. 6.
4. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de las secuencias codificantes para un fragmento de anticuerpo tipo Fab, cuyos dominios constantes son de una inmunoglobulina humana consenso tipo IgG.
5. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 4, caracterizado porque las secuencias codificantes para el fragmento tipo Fab son las SEC ID No. 9 y SEC ID No. 10.
6. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de la secuencia codificante para una cadena polipeptídica, constituida por un fragmento scFv unido por un espaciador a los dominios constantes bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina

humana, que en su forma proteica se asocia covalentemente a otra cadena polipeptídica idéntica para formar una molécula dimérica.

- 5 7. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 6, caracterizado porque los dominios constantes de inmunoglobulina humana son de tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
8. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 6-7, caracterizado porque la secuencia codificante para la cadena polipeptídica constituida por un fragmento scFv unido por un espaciador a los dominios constantes bisagra, CH2 y CH3 es la SEC ID No. 13 o es la SEC ID No. 14.
- 10 9. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque adicionalmente contiene un isótopo radiactivo, o un agente químico o biológico que posean potencial antitumoral o anti-angiogénico.
- 15 10. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque adicionalmente contiene un isótopo radiactivo que le confiere potencial para el diagnóstico *in vivo* de tumores.
11. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque son producidos en bacterias y levaduras recombinantes, o en células de mamíferos u otros sistemas de eucariotes.
- 20 12. Vectores que codifican para anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1-8, obtenidos mediante la manipulación genética por vía del ADN recombinante, siendo estos vectores plasmidios o secuencias capaces de integrarse en células hospederas.
13. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante de las reivindicaciones 1-9.
- 25 14. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como entidades oculares, procesos neoplásicos, inflamatorios agudos y crónicos, y procesos autoinmunes, mediante la inmunoterapia pasiva.

15. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos y sus metástasis, mediante la inmunoterapia pasiva.
- 5 16. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, mediante la inmunoterapia pasiva.
17. Uso del anticuerpo recombinante de la reivindicación 10 para la fabricación de un radiofármaco para el diagnóstico *in vivo* de tumores malignos y sus metástasis, mediante técnicas de imágenes.

10

15

Figura 1

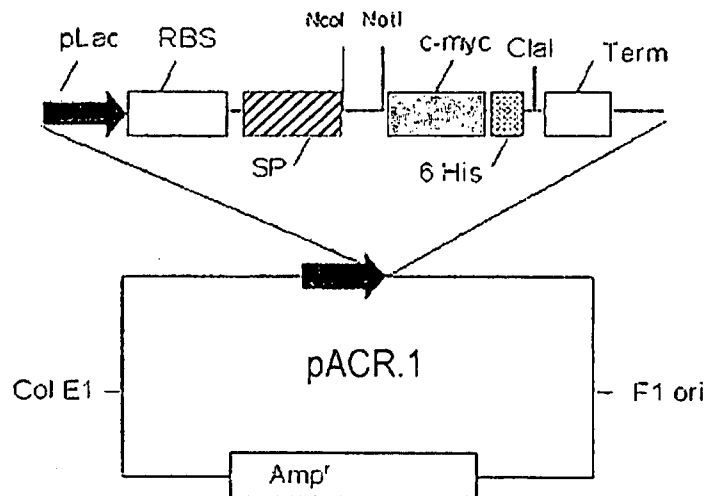


Figura 2

Región variable de cadena pesada:

CAGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTCTGA
 AGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGT
 CAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGA CTCTGATAC
CAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCA
 CCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGC
 GAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTT
 CG

Segmento de unión (linker):

GCCCCTCAGGCCAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGAC

Región variable de cadena ligera:

CAGGCTGTGGTGA CTCTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCAGGAGGGACAGTCACTC
 TCACCTGTGCTTCCAGCATTGGAGCAGTCACCACTGGTAACTATCCAAACTGGTTCCAG
 CAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAAGCAACAAACACTCCTG
 GACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACCCCTTTCG
 GGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTACTGCTTGCTCTCCTATAGTGGTGCTCG
GCCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

Sitio de clonaje-empalme-c myc-empalme-histidinas:

GCGGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCA
 TCACCATCAC

Figura 3

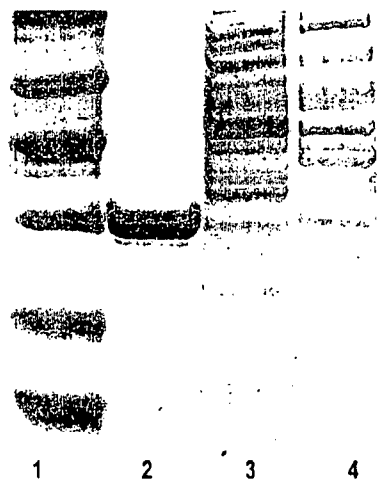


Figura 4

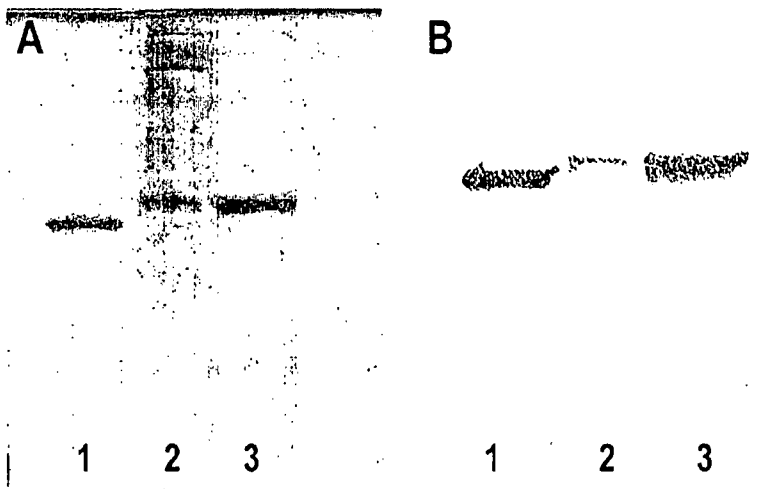


Figura 5

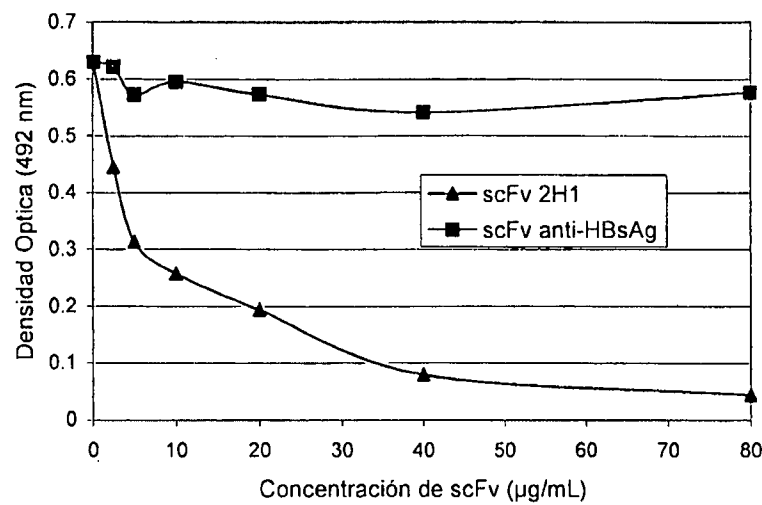


Figura 6

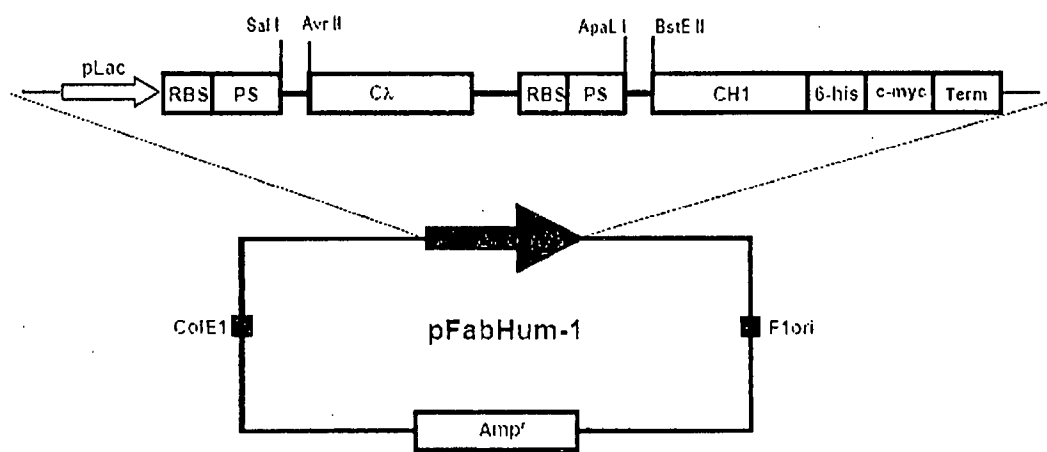


Figura 7**A**

Región variable de cadena ligera y dominio Cλ:

GTCGACCAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAG
TCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCATTGGAGCAGTCACCAGTGGTAACTATCCAAACTGGT
TCCAGCAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAAGCAACAAACAC
TCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACCC
TTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTACTGCTTGCTCTCCTATAGTGGT
GCTCGGCCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTGTCCTAGGTCAGC
CCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC
AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG
GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCCTCCAAACAA
AGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGT
CCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGT
GGCCCCTACAGAATGTTCA

B

Región variable de cadena pesada, dominio CH1, empalme, histidinas,
empalme y c-myc:

CAGCAGGTCCAGCTGGTGAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTCTGA
AGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGT
CAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATAC
CAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCA
CCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGC
GAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAA
GCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC
AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
AGTTGAGCCCAAATCTTGTGCGGCCGCACATCACCATCACCATCACGGGGCCGCAGAAC
AAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

Figura 8

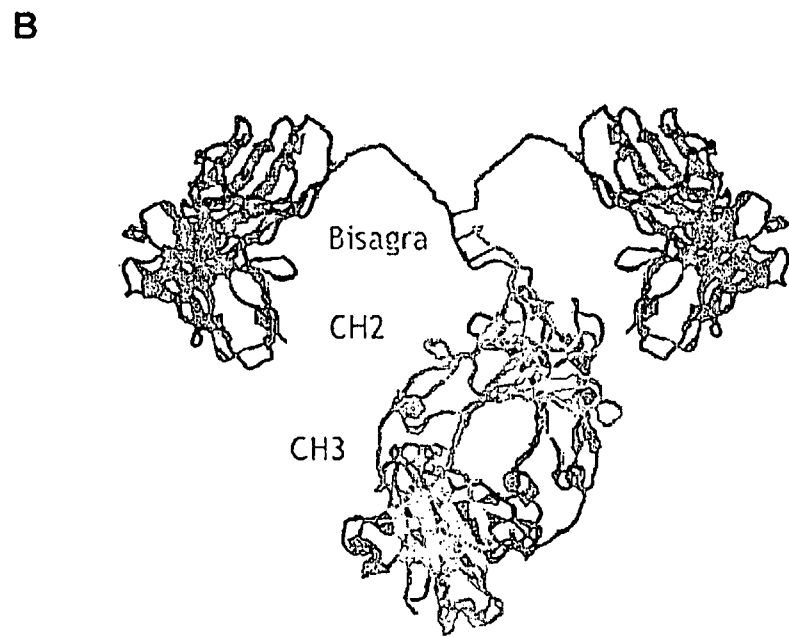
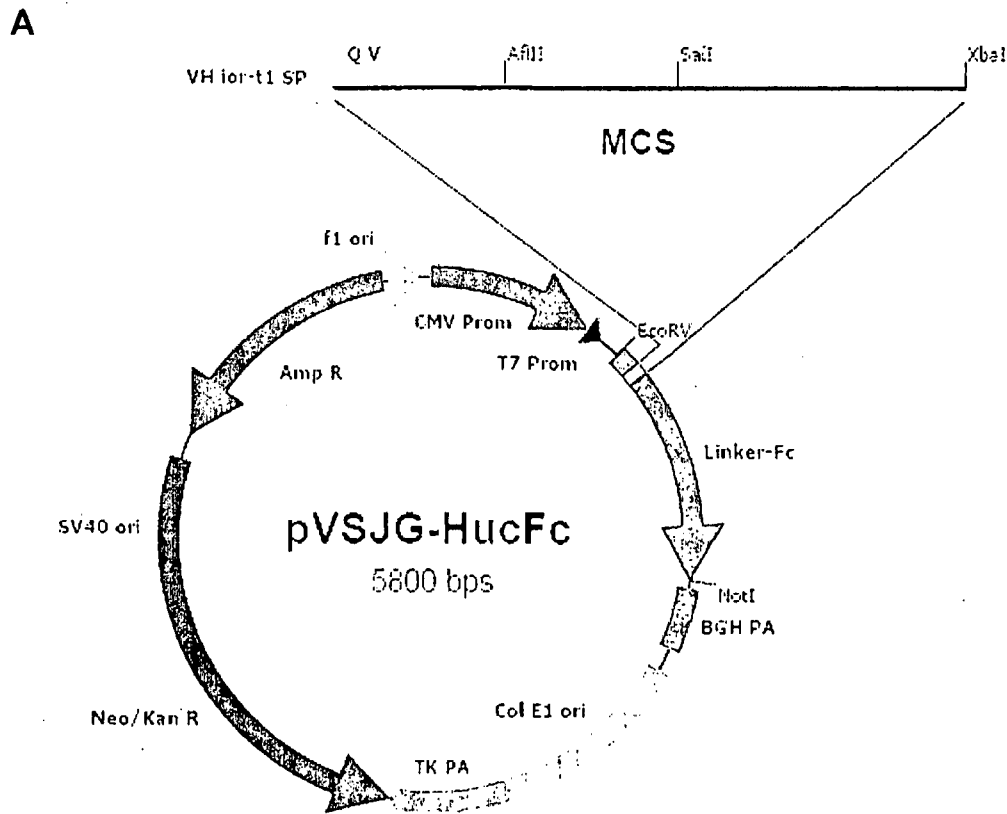


Figura 9

Región variable de cadena pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTC
TGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCT
GGGTGCGCCAGATGCCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCA
GCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC
GGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTG
GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG

Segmento de unión (*linker*):

GCCCCTCAGGCCAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGAC

Región variable de cadena ligera:

CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGT
CACTCTCACCTGTGCTTCCAGCACTGGAGCAGTCACCAGTGGTAACTATCCAAA
CTGGTTCCAGCAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAA
GCAACAAACACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGC
AAAGCTGCCCTGACCCTTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTA
CTGCTTGCTCTCCTATAGTGGTGCTCGGCCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGG
TCACCGTCCTAGGT

Espaciador:

TCTAGAGGCGGAGGTGGATCGGGCGGAGGTGGATCG

Bisagra-CH2-CH3:

GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

Figura 10

Región variable de cadena pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTC
TGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCT
GGGTGCGTCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCA
GCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC
GGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTG
GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG

Segmento de unión (*linker*):

GCCCCTCAGGCCAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGAC

Región variable de cadena ligera:

CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGT
CACTCTCACCTGTGCTTCCAGCATTGGAGCAGTCACCACTGGTAACTATCCAA
CTGGTTCCAGCAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAA
GCAACAAACACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGC
AAAGCTGCCCTGACCCTTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTA
CTGCTTGCTCTCCTATAGTGGTGCTCGGCCGGTGTTGGCGGAGGGACCAAGC
TGACCGTCCTAGGT

Espaciador:

TCTAGAGGCGGAGGTGGATCGGGCGGAGGTGGATCG

Bisagra-CH2-CH3:

GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

Figura 11

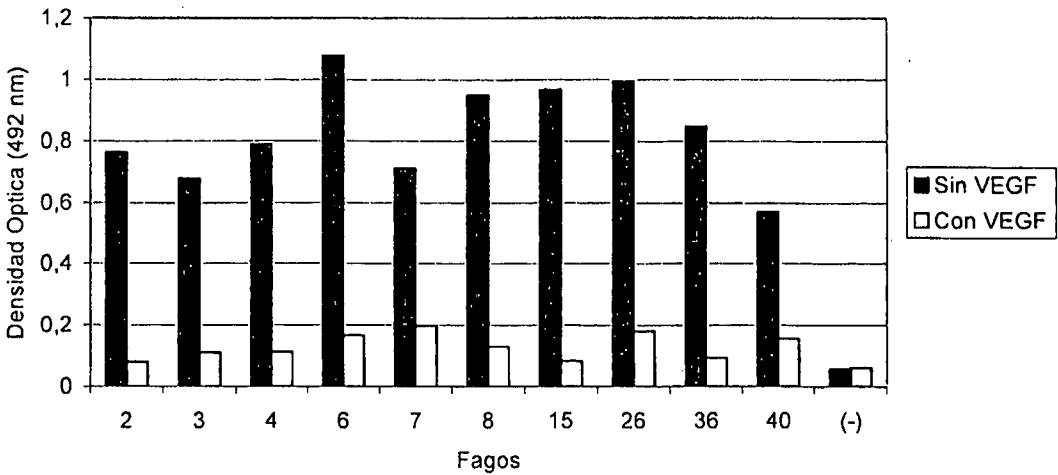
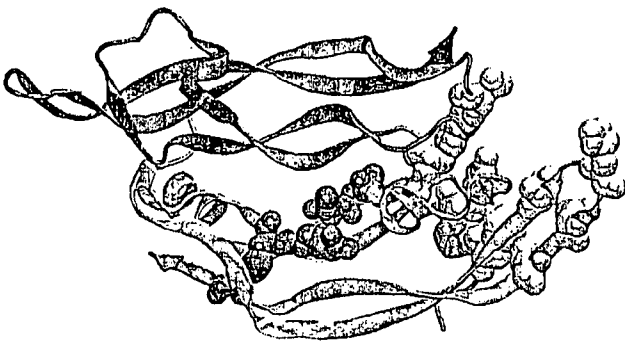


Figura 12

A



B

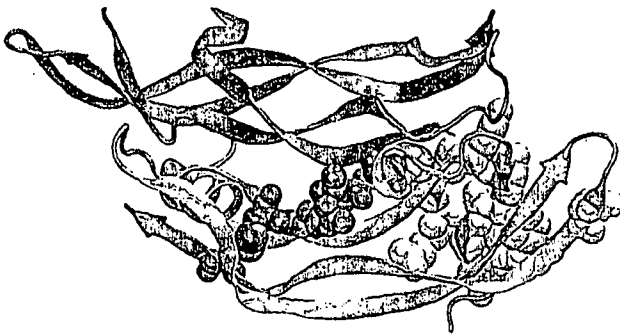
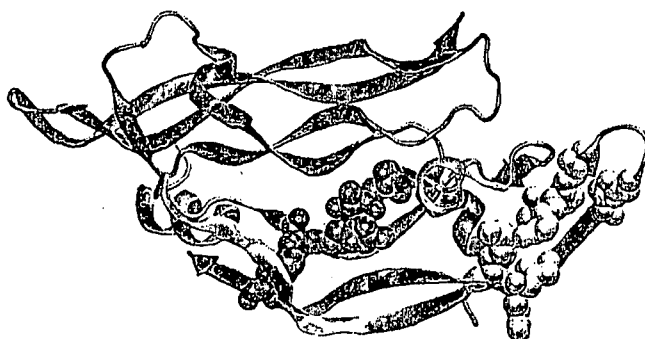
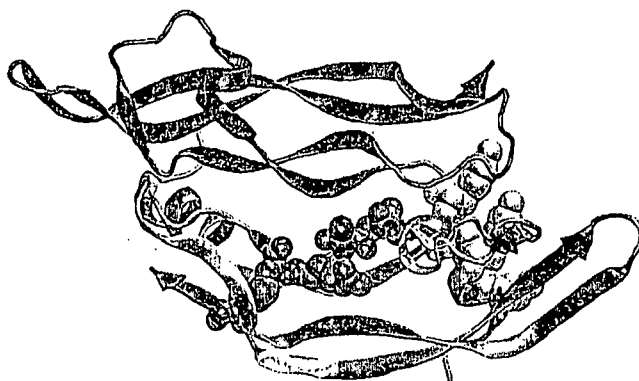


Figura 12

C



D



E

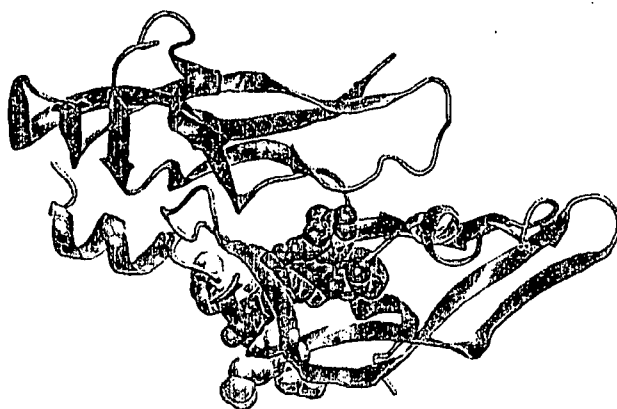


Figura 13

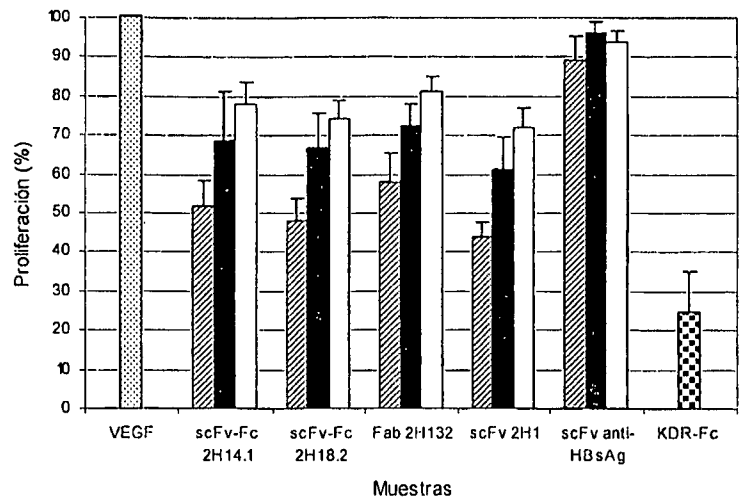
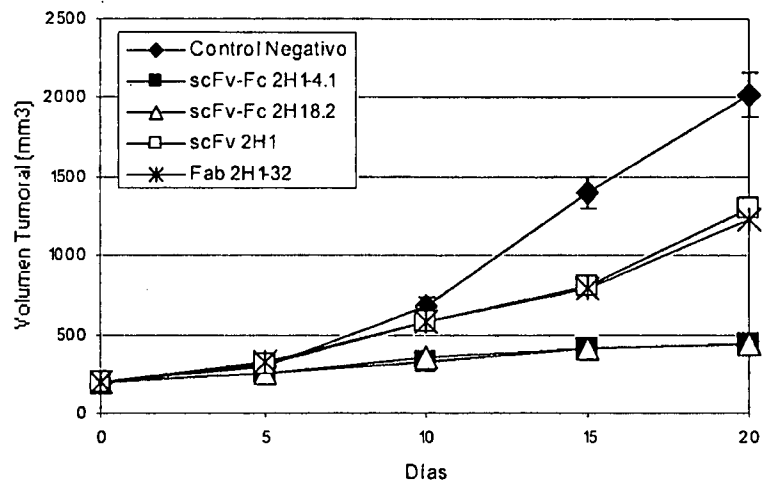


Figura 14

A



B

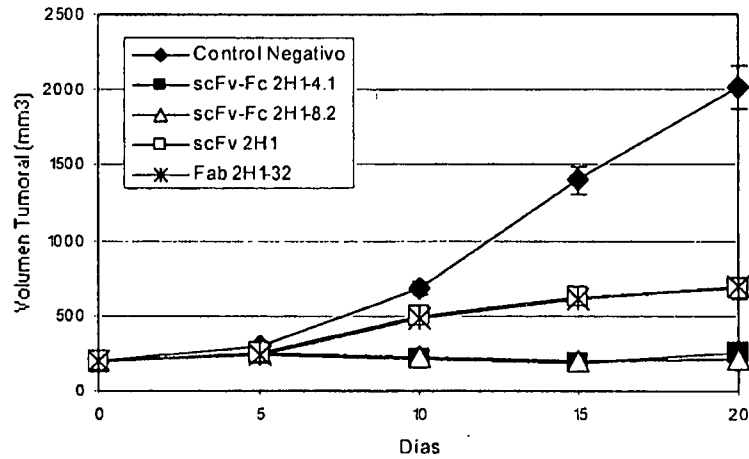
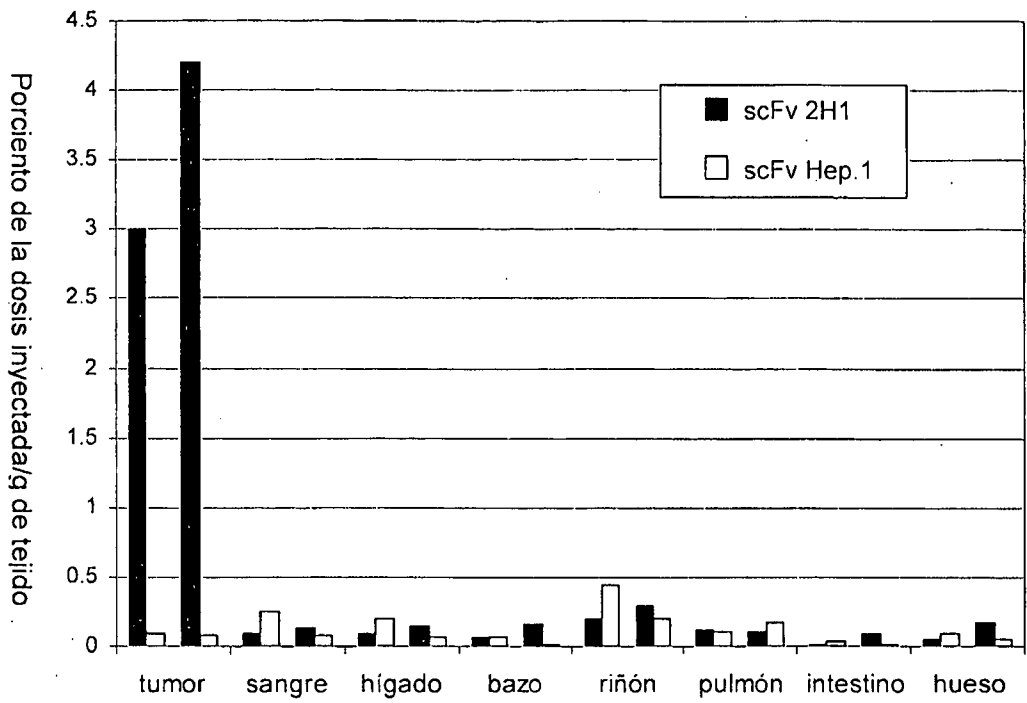


Figura 15



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> Anticuerpos Recombinantes contra el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

<130> anti-angio CIGB

<140>

<141>

<150> CU 2006- 0208

<151> 2006-11-01

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:OLIGONUCLEOTIDO SINTETICO

<400> 1

gatctgctag ccgcacccat ggcagaagga ggaggg 36

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:OLIGONUCLEOTIDO SINTETICO

<400> 2

gggggatccc cgcctcggct tgtcac 26

<210> 3

<211> 558

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggccttag ttgaattgaa agtgcccgac attggcggac acgaaaatgt agatattatc 60
gcggttgaag taaacgtggg cgacactatt gctgtggacg ataccctgat tactttggat 120
ctagatcacg atgacgatga cgataaagct tcagatctgc tagccgcacc catggcagaa 180
ggaggagggc agaatcatca cgaagtgggtg aagtctcatgg atgtctatca gcgcagctac 240
tgccatccaa tcgagaccct ggtggacatc ttccaggagt accctgatga gatcgagtac 300
atcttcaagc catcctgtgt gccctgatg cgatgcgggg gctgctgcaa tgacgagggc 360
ctggagtgtg tgcccactga ggagtccaac atcaccatgc agattatgga gatcgaacct 420
gagcaaggcc agcacatagg agagatgagc ttcctacagc acaacaaatg tgaatgcaga 480
ccaaagaaag atagagcaag acaagaaaaa tgtgacaagc cgaggcgggg atcccgggca 540
caccatcacc atcaccat 558

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia
Artificial:OLIGONUCLEOTIDO SINTETICO

<400> 4
ctattctccc atggcacag 19

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia
Artificial:OLIGONUCLEOTIDO SINTETICO

<400> 5
ttctgtatga ggttttgc 18

<210> 6
<211> 804
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:FRAGMENTO
DE ANTICUERPO RECOMBINANTE

<400> 6
cagcaggtcc agctggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag 60
atctcctgta agggttctgg atacagcttt accagctact ggatcggctg ggtgcgtcag 120
atgcccgga aaggcctgga gtggatggg atcatctatc ctggtgactc tgataccaga 180
tacagcccgt cttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat cagcaccgcc 240
tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg tgcgagactc 300
gtggttaggg atacagaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcgggccct 360
caggccaaat cctcaggatc aggtccgaa tccaaagtcg accaggctgt ggtgactcag 420
gagccctcac tgactgtgtc cccaggaggg acagtcactc tcacctgtgc ttccagcatt 480
ggagcagtca ccagtggtaa ctatccaaac tggttccagc agagacctgg acagccacc 540
agggcactga tttatagtac aagcaaaaa cactcctgga cccctgcccg gttctcaggc 600
tccctccttg ggggcaaagc tgccctgacc ctttcgggtg cgcagcctga ggatgaggct 660
gagtattact gcttgctctc ctatagtggg gctcgcccg tggtcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgctggatcc gaacaaaagc tgatctcaga agaagaccta 780
aactcacatc accatcacca tcac 804

<210> 7
<211> 354
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
cagcaggtcc agctggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag 60
atctcctgta agggttctgg atacagcttt accagctact ggatcggctg ggtgcgtcag 120
atgcccgga aaggcctgga gtggatggg atcatctatc ctggtgactc tgataccaga 180
tacagcccgt cttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat cagcaccgcc 240
tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg tgcgagactc 300
gtggttaggg atacagaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcg 354

<210> 8
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60
acctgtgctt ccagcattgg agcagtcacc agtggttaact atccaaactg gttccagcag 120
agacctggac agccaccag ggcactgatt tatagtacaa gcaacaaaca ctcttgacc 180

```
cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgaccct ttcgggtgcg 240
cagcctgagg atgaggctga gtattactgc ttgctctcct atagtgggtgc tcggccgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333
```

<210> 9
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:CADENA
 LIGERA FRAGMENTO FAB RECOMBINANTE

```
<400> 9
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60
acctgtgctt ccagcattgg agcagtcacc agtggttaact atccaaactg gttccagcag 120
agacctggac agccaccag ggactgatt tatagtacaa gcaacaaaca ctcttgacc 180
cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgaccct ttcgggtgcg 240
cagcctgagg atgaggctga gtattactgc ttgctctcct atagtgggtgc tcggccgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc 360
tcggctactc tgttcccacc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacttggtg 420
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc 480
cccgtcaagg cgggagtggg gaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg 540
gccagcagct acctgagcct gacgcctgag cagtggaaag cccacaaaag ctacagctgc 600
caggtcacgc atgaagggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttca 657
```

<210> 10
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:CADENA
 PESADA FRAGMENTO FAB RECOMBINANTE

```
<400> 10
cagcaggctc agctgggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag 60
atctcctgta aggttcttgg atacagcttt accagctact ggatcgggtg ggtgcgtcag 120
atgcccggga aaggcctgga gtggatgggg atcatctatc ctggtgactc tgataccaga 180
tacagcccgt ccttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat cagcaccgcc 240
tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg tgcgagactc 300
gtgggttaggg atacagaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgcctcc 360
accaagggcc catcgttctt cccctgggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtccacacc ttcccggtg tcctacagtc ctgaggactc 540
tactccctca gcagcgtagt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaactc 660
tgtgcggccg cacatcacca tcaccatcac ggggccgcag aacaaaaaact catctcagaa 720
gaggatctga at 732
```

<210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia
 Artificial:OLIGONUCLEOTIDO SINTETICO

```
<400> 11
acagggctta aggaggtgca gctgggtgcag tctgg 35
```

<210> 12
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia
Artificial:OLIGONUCLEOTIDO SINTETICO

<400> 12

tgttggttcta gaacctagga cgggtgacctt ggtccc

36

<210> 13

<211> 1467

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:ANTICUERPO
RECOMBINANTE

<400> 13

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	cgggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgccagatg	120
cccggaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgctct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgc	gagactcgtg	300
gttagggata	cagaaatctg	gggccaagg	acaatggtca	ccgtctcttc	ggccccctcag	360
gccaaatcct	caggatcagg	ctccgaatcc	aaagtcgacc	aggctgtggt	gactcaggag	420
ccctcactga	ctgtgtcccc	aggagggaca	gtcactctca	cctgtgcttc	cagcactgga	480
gcagtcacca	gtggtaacta	tccaaactgg	ttccagcaga	gacctggaca	gccacccagg	540
gcactgattt	atagtacaag	caacaaacac	tcctggaccc	ctgcccgggt	ctcaggctcc	600
ctccttgggg	gcaaagctgc	cctgaccctt	tcgggtgcgc	agcctgagga	tgaggctgag	660
tattactgct	tgctctccta	tagtggtgct	cggccgggtg	tcggcggagg	gaccaaggtc	720
accgtcctag	gttctagagg	cggaggtgga	tcgggcggag	gtggatcggc	agagcccaaa	780
tcttggtgaca	aaactcacac	atgccaccg	tgcccagcac	ctgaactcct	ggggggaccg	840
tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaacccaag	gacaccctca	tgatctccc	gaccctcag	900
gtcacatgcg	tggtggtgga	cgtgagccac	gaagaccctg	aggtcaagtt	caactggtac	960
gtggacggcg	tgaaggtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	1020
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggaaggag	1080
tacaagtgca	aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccca	tcgagaaaa	catctccaaa	1140
gccaaagggc	agccccgaga	accacaggtg	tacaccctgc	ccccatccc	ggatgagctg	1200
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatcccag	cgacatcgcc	1260
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgctgctg	1320
gactccgacg	gctccttctt	cctctacagc	aaagtcaccg	tggaacaag	caggtggcag	1380
caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggtc	tgcaacaaca	ctacacgcag	1440
aagagcctct	ccctgtctcc	gggtaaa				1467

<210> 14

<211> 1467

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:ANTICUERPO
RECOMBINANTE

<400> 14

gaggtgcagc	tggtgcagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	cgggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgtcagatg	120
cccggaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatac	180
agcccgctct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgc	gagactcgtg	300
gttagggata	cagaaatctg	gggccaagg	acaatggtca	ccgtctcttc	ggccccctcag	360
gccaaatcct	caggatcagg	ctccgaatcc	aaagtcgacc	aggctgtggt	gactcaggag	420
ccctcactga	ctgtgtcccc	aggagggaca	gtcactctca	cctgtgcttc	cagcattgga	480
gcagtcacca	gtggtaacta	tccaaactgg	ttccagcaga	gacctggaca	gccacccagg	540
gcactgattt	atagtacaag	caacaaacac	tcctggaccc	ctgcccgggt	ctcaggctcc	600
ctccttgggg	gcaaagctgc	cctgaccctt	tcgggtgcgc	agcctgagga	tgaggctgag	660
tattactgct	tgctctccta	tagtggtgct	cggccgggtg	tcggcggagg	gaccaagctg	720

accgtcctag gttctagagg cggaggtgga tcgggcgagg gtggatcggc agagcccaaa 780
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 840
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccttgag 900
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 960
gtggacggcg tgaaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1020
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1080
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1140
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1200
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1320
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1380
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1440
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1467

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:PEPTIDO
SINTETICO

<400> 15
Cys Cys Arg Thr Leu Met Leu Leu Gln Tyr His Arg
1 5 10

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud internacional n° PCT/CU2007/000019																		
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. C07K16/22																				
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.																				
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA																				
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) C07K																				
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda																				
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, WPI-Data, BIOSIS																				
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES																				
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°																		
Y	MULLER Y A ET AL: "VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR: CRYSTAL STRUCTURE AND FUNCTIONAL MAPPING OF THE KINASE DOMAIN RECEPTOR BINDING SITE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 94, no. 14, Julio 1997 (1997-07), páginas 7192-7197, XP000918906 ISSN: 0027-8424 . todo el documento ----- -/-	1-17																		
☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos																				
☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo																				
<table><tr><td>* Categorías especiales de documentos citados:</td><td>"T"</td><td>documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</td></tr><tr><td>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</td><td>"X"</td><td>documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</td></tr><tr><td>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</td><td>"Y"</td><td>documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</td></tr><tr><td>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</td><td>"&"</td><td>documento que forma parte de la misma familia de patentes.</td></tr><tr><td>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</td><td></td><td></td></tr><tr><td>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</td><td></td><td></td></tr></table>			* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.	"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.	"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.	"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.	"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.			"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.																		
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.																		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.																		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.																		
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.																				
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.																				
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 11 Marzo 2008		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 26 Marzo 2008																		
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado																		
N° de fax		N° de teléfono																		

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/CU2007/000019

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	ASANO M ET AL : "AN ANTI-HUMAN VEGF MONOCLONAL ANTIBODY , MV833 , THAT EXHIBITS POTENT ANTI-TUMOR ACTIVITY IN VIVO" HYBRIDOMA , LIEBERT , NEW YORK , NY , US , vol . 17 , no . 2 , Abril 1998 (1998-04) , páginas 185-190 , XP009046722 ISSN : 0272-457X todo el documento -----	1-17
Y	BREKKEN R A ET AL : "Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Fl k-1) activi y by a monoclonal anti -VEGF antibody blocks tumor growth in mice" CANCER RESEARCH , AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE , MD , US , vol . 60 , no . 18, 15 Septiembre 2000 (2000-09-15) , páginas 5117-5124 , XP002340113 ISSN : 0008-5472 todo el documento -----	1-17
Y	MULLER ET AL : "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4. A resolution and mutational analysis of the interface" STRUCTURE , CURRENT BIOLOGY LTD . , PHILADELPHIA, PA , US , vol . 6 , no . 9 , 15 Septiembre 1998 (1998-09-15) , páginas 1153-1167 , XP002986094 ISSN : 0969-2126 todo el documento -----	1-17
Y	BREKKEN R A ET AL : "VEGF-VEGF receptor complexes as markers of tumor vascular endothelium" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE , ELSEVIER, AMSTERDAM , NL , vol. 74 , no . 1-3 , 6 Julio 2001 (2001-07-06) , pages 173-181 , XP004297522 ISSN : 0168-3659 todo el documento -----	1-17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/CU2007/000019

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	VITALITI ALESSANDRA ET AL: "Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor" CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 16, 15 Agosto 2000 (2000-08-15), páginas 4311-4314, XP002472296 ISSN: 0008-5472 todo el documento -----	1-17
Y	FUH GERMAINE ET AL: "Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the AVASTIN (TM) Fab" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 10, Marzo 2006 (2006-03), páginas 6625-6631, XP002472297 ISSN: 0021-9258 todo el documento -----	1-17
Y	JAYSON GORDON C ET AL: "Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: Implications for trial design of antiangiogenic antibodies" JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE (BETHESDA), vol. 94, no. 19, 2 Octubre 2002 (2002-10-02), páginas 1484-1493, XP002472298 ISSN: 0027-8874 todo el documento -----	1-17

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
 (Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
 (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference Neur. diabet	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/CU2007/000019	International filing date (day/month/year) 30.10.2007	Priority date (day/month/year) 01.11.2006	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/22			
Applicant CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA			
1. This report is the International preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>3</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2008-06-23		Date of completion of this report 16.02.2009	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Kalsner, Inge Telephone No. +49 89 2399-8708 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/CU2007/000019

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ 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 (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-51 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-5 as originally filed

Claims, Numbers

1-17 received on 15.07.2008 with letter of 20.06.2008

Drawings, Sheets

1/15-15/15 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/CU2007/000019

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-17</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/CU2007/000019

Ad Section V: Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

1) Amendments

The amendments filed with the letter dated 23 June 2008 are formally allowable under Art. 34(2)(b) PCT.

2) Novelty and inventive step (Art. 33(2)(3) PCT)

- 2.1) The present application relates to a VEGF-A monoclonal antibody or Fab or scFv fragments thereof which are defined by the nucleic acid encoding them. Treatment of tumour cells with the antibody or the respective fragments has been shown to cause a reduction in vascular density and in an increase in tumour cell apoptosis.

As the nucleic acid sequences encoding the claimed antibody have not been disclosed in the state of the art, claims relating to the antibody, and claims directed to its use in various medical applications can be considered to meet the requirements of Art. 33(2) PCT.

- 2.2) The claims, however, are not considered to meet the requirements of Art. 33(3) PCT as they are considered to lack an inventive step.

Monoclonal antibodies directed to VEGF are widely known in the state of the art. Several antibodies have even already been approved for medical applications.

Any one of the documents cited in the International Search Report may be considered to represent the closest prior art. The difference between the prior art and the present application lies in the different nucleic acid sequence encoding the antibody fragment.

The provision of yet a further monoclonal antibody directed against VEGF and displaying anti-angiogenic activity, however, cannot be considered to involve an inventive step.

Applicants argue that the antibodies of the present application are further

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/CU2007/000019

distinguished from those of the prior art by the different epitope they recognise and thus an inventive step should be recognised.

It is, however, not apparent from the application that the fact, that the claimed antibodies recognise a different epitope, imparts any unexpected and/or surprising effects. The IPEA thus maintains its objection.

93

Application No. PCT/CU2007/000019
Amended claims

1. Recombinant antibodies that interfere with the pro-angiogenic effect of human VEGF-A, and that are characterized in that they comprehend human Immunoglobulin variable regions encoded by nucleotide sequences SEQ ID No. 7 and SEQ ID No. 8, or homologous sequences, and recognize an epitope in human VEGF-A defined by antigen residues C102, C57, R56, T31 and L32.
2. Recombinant antibody according to claim 1, characterized in that sequences SEQ ID No. 7 and SEQ ID No. 8, or homologous sequences, are comprised within the sequence encoding for a single chain Fv antibody fragment (scFv) where the heavy and light chain variable regions of human antibody origin are separated by a linker segment.
3. Recombinant antibody according to claim 2, where the scFv encoding sequence is SEQ ID No. 6.
4. Recombinant antibody according to claim 1, characterized in that sequences SEQ ID No. 7 and SEQ ID No. 8, or homologous sequences, are comprised within the sequence encoding for a Fab type antibody fragment, with constant domains of a consensus human IgG immunoglobulin.
5. Recombinant antibody according to claim 4, characterized in that the encoding sequences for the Fab type fragment are SEQ ID No. 9 and SEQ ID No. 10.
6. Recombinant antibody according to claim 1, characterized in that sequences SEQ ID No. 7 and SEQ ID No. 8, or homologous sequences, are comprised within the sequence encoding for a polypeptide chain, constituted by a scFv fragment linked by a spacer to human immunoglobulin hinge, CH2 and CH3 constant domains, that in its protein form covalently associates to another identical polypeptide chain to form a dimeric molecule.

94

7. Recombinant antibody according to claim 6, characterized in the human immunoglobulin constant domains are of the IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 types.
8. Recombinant antibody according to claims 6 and 7, characterized in that the sequences encoding for the polypeptide chain, constituted by a scFv fragment linked by a spacer to hinge, CH2 and CH3 constant domains, are SEQ ID No. 13 or SEQ ID No. 14.
9. Recombinant antibody according to claims 1 to 8, characterized in that it additionally contains a radioactive isotope, or a chemical or biological agent that possess anti-tumor or anti-angiogenic potential.
10. Recombinant antibody according to claims 1 to 8, characterized in that it additionally contains a radioactive isotope that confers potential for *in vivo* tumor diagnosis.
11. Recombinant antibody according to claims 1 to 8, characterized in that it is produced by recombinant bacteria or yeast, or in mammalian cells or other eukaryote systems.
12. Vectors that encode for recombinant antibodies according to claims 1 to 8, obtained through genetic manipulation via recombinant DNA, being these vectors plasmids or sequences capable of integrating into host cells.
13. Pharmaceutical composition that comprehends the recombinant antibody in claims 1 to 9.
14. Use of the recombinant antibodies of claims 1 to 9 for the manufacturing of a medicament for the treatment of entities that develop with an increase in angiogenesis, as eye entities, neoplastic processes, acute and chronic inflammatory processes, and autoimmune processes, through passive immunotherapy.
15. Use of the recombinant antibodies of claims 1 to 9 for the manufacturing of a medicament for the treatment of malignant tumors and metastases, through passive immunotherapy.

95

16. Use of the recombinant antibodies of claims 1 to 9 for the manufacturing of a medicament for the treatment of age-related macular degeneration, through passive immunotherapy.
17. Use of the recombinant antibody of claim 10 for the manufacturing of a radiopharmaceutical for the *in vivo* diagnosis of malignant tumors and its metastases, employing imaging techniques.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

- PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

Solicitud No. PCT/CU2007/000019

Reivindicaciones Reformadas

1. Anticuerpos recombinantes que interfieren con el efecto pro-angiogénico del VEGF-A humano y que están caracterizados porque estos comprenden regiones variables de inmunoglobulinas humanas codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8 o secuencias homólogas y reconocen un epítipo en el VEGF-A humano definido por residuos de antígeno C102, C57, R56, T31 y L32.
2. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No.7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de la secuencia codificante para un fragmento de anticuerpo tipo Fv de cadena simple (scFv), en donde las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpo de origen humano están separadas por un segmento de unión (linker).
3. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 2, en donde la secuencia codificante para el scFv es la SEC ID No. 6.
4. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de las secuencias codificantes para un fragmento de anticuerpo tipo Fab, con dominios constantes de una inmunoglobulina humana consenso tipo IgG.
5. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 4, caracterizado porque las secuencias codificantes para el fragmento tipo Fab son las SEC ID No. 9 y SEC ID No. 10.
6. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de la secuencia codificante para una cadena polipeptídica, constituida por un fragmento scFv unido por un espaciador a los dominios constantes bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina

humana, que en su forma proteica se asocia covalentemente a otra cadena polipeptídica idéntica para formar una molécula dimérica.

7. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 6, caracterizado porque los dominios constantes de inmunoglobulina humana son de tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
8. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado porque las secuencias codificantes para la cadena polipeptídica, constituida por un fragmento scFv unido por un espaciador a los dominios constantes bisagra, CH2 y CH3 son las SEC ID No. 13 o SEC ID No. 14.
9. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque adicionalmente contiene un isótopo radioactivo, o un agente químico o biológico que posee potencial antitumoral o anti-angiogénico.
10. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque adicionalmente contiene un isótopo radioactivo que le confiere potencial para diagnóstico *in vivo* de tumores.
11. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque es producido por levaduras y bacterias recombinantes o en células de mamíferos u otros sistemas eucariotes.
12. Vectores que codifican para anticuerpos recombinantes de según las reivindicaciones 1 a 8, obtenidos mediante la manipulación genética por vía del ADN recombinante, siendo estos vectores plasmidios o secuencias capaces de integrarse en células huésped.
13. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante de las reivindicaciones 1 a 9.
14. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como entidades oculares, procesos

neoplásicos, procesos inflamatorios agudos y crónicos y procesos autoinmunes, mediante la inmunoterapia pasiva.

15. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos y sus metástasis, mediante la inmunoterapia pasiva.
16. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, mediante la inmunoterapia pasiva.
17. Uso del anticuerpo recombinante de la reivindicación 10 para la fabricación de un radiofarmacéutico para el diagnóstico *in vivo* de tumores malignos y sus metástasis, mediante técnicas de imágenes.

DVZ\DVZ\ID-150145\WPCL002H

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 2006-0208 01/11/2006 CU	(51) Int Cl: C07K 016/022 (71) Solicitante(s) CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (72) Inventor(es) HUMBERTO LAMDAN ORDAS Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 01/06/2009 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30/10/2007 No. de solicitud PCT/CU2007/000019	(87) Publicación internacional Fecha: 08/05/2008 N° publicación: WO 2008/052489 A1
(54) Titulo: ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELLO VASCULAR (VEGF)	

Reivindicación(es):

1. Anticuerpos recombinantes caracterizados porque comprenden regiones variables de inmunoglobulinas humanas codificadas por las secuencias nucleotídicas SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, que reconocen un epítipo en el VEGF-A humano definido alrededor de, aunque no necesariamente limitado a, sus residuos C102, C57, R56, T31 y L32, e Interfieren con su efecto pro-angiogénico.
2. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de la secuencia codificante para un fragmento de anticuerpo tipo Fv de cadena simple (scFv), donde las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpo de origen humano están separadas por un segmento de unión (linker).
3. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia codificante para el scFv es la SEC ID No. 6.
4. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de las secuencias codificantes para un fragmento de anticuerpo tipo Fab, cuyos dominios constantes son de una inmunoglobulina humana consenso tipo IgG.
5. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 4, caracterizado porque las secuencias codificantes para el fragmento tipo Fab son las SEC ID No. 9 y SEC ID No. 10.
6. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias SEC ID No. 7 y SEC ID No. 8, o secuencias homólogas, están comprendidas dentro de la secuencia codificante para una cadena polipeptídica, constituida por un fragmento scFv unido por un espaciador a los dominios constantes bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana, que en su forma proteica se asocia covalentemente a otra cadena polipeptídica idéntica para formar una molécula dimerica.
7. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 6, caracterizado porque los dominios constantes de inmunoglobulina humana son de tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

8. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 6-7, caracterizado porque la secuencia codificante para la cadena polipeptídica constituida por un fragmento scFv unido por un espaciador a los dominios constantes bisagra, CH2 y CH3 es la SEC ID No. 13 o es la SEC ID No. 14.
9. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque adicionalmente contiene un isótopo radiactivo, o un agente químico o biológico que posean potencial antitumoral o anti-angiogénico.
10. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque adicionalmente contiene un isótopo radiactivo que le confiere potencial para el diagnóstico in vivo de tumores.
11. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque son producidos en bacterias y levaduras recombinantes, o en células de mamíferos u otros sistemas de eucariotes.
12. Vectores que codifican para anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1-8, obtenidos mediante la manipulación genética por vía del AON recombinante, siendo estos vectores plasmidios o secuencias capaces de integrarse en células hospedadoras.
13. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante de las reivindicaciones 1-9.
14. Uso de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como entidades oculares, procesos neoplásicos, inflamatorios agudos y crónicos, y procesos autoinmunes, mediante la inmunoterapia pasiva.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800178089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 36,601
FECHA : MAYO 18 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-056360- -00000-0000

Fecha: 2009-06-01 17:39:15 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105601145	18/05/2009	59,725,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0020: 08972-841-0070

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 38,533
FECHA : MAYO 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-056360- -00000-0000

Fecha: 2009-06-01 17:39:15 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105577986	26/05/2009	35,575,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	25,000.00
	TOTAL :	\$ 25,000.00

SDN: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010.08972-841-007-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 38,534
FECHA : MAYO 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-056360- -00000-0000

Fecha: 2009-06-01 17:39:15 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105577986	26/05/2009	35,575,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	25,000.00
	TOTAL :	\$ 25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0101.08972-841-007-0.



No. 09-056360- -00000-0000

Fecha: 2009-06-01 17:39:15 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [☒]

MODELO DE UTILIDAD [☐]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 [☒]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]

DISEÑO INDUSTRIAL [☐]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 [☐]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [☐]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☐]
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado [☐]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha JUNIO - 2009

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

105

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

REFERENCIA	Radicación No.	9 56360
	Solicitud internacional	PCT/CU2007/000019
	Fecha inicio fase nacional	01/06/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	6921

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 19 JUN. 2009
jfernand