

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 245 833**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.1999 E 99968115 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **03.04.2013 EP 1140173**

54

Título: **Antagonistas del factor de crecimiento celular del endotelio vascular y usos de los mismos**

30

Prioridad:

22.12.1998 US 218481

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:

19.07.2013

73

Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72

Inventor/es:

VAN BRUGGEN, NICHOLAS y

FERRARA, NAPOLEONE

74

Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 245 833 T5

DESCRIPCIÓN

Antagonistas del factor de crecimiento celular del endotelio vascular y usos de los mismos

5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere al uso de antagonistas del factor de crecimiento celular del endotelio vascular (VEGF) en la fabricación de un medicamento para propósitos terapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la fabricación de un medicamento para el tratamiento de edema.

10

Antecedentes de la Invención

Los dos componentes celulares principales de la vasculatura son las células endoteliales y las células del músculo liso. Las células endoteliales forman el revestimiento de la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, y constituyen una superficie de contacto no trombogénica entre la sangre y el tejido. Además, las células endoteliales son un componente importante para el desarrollo de nuevos capilares y vasos sanguíneos. Por tanto, las células endoteliales proliferan durante la angiogénesis, o neovascularización, asociada con crecimiento tumoral y metástasis, así como una diversidad de enfermedades o trastornos no neoplásicos.

15

20

Según se dice, diversos polipéptidos de origen natural inducen la proliferación de células endoteliales. Entre esos polipéptidos están los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) básicos o ácidos, Burgess and Maciag, *Annual Rev. Biochem.*, 58:575 (1989), factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), Ishikawa, et al., *Nature*, 338:557 (1989), y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), Leung, et al., *Science* 246:1306 (1989); Ferrara & Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:851 (1989); Tischer, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:1198 (1989); Ferrara, et al., *Publicación de Patente PCT N° WO 90/13649* (publicada el 15 de noviembre de 1990).

25

VEGF se identificó por primera vez en medios condicionados por células foliculares y foliculoestrelladas de pituitaria bovina. Los análisis bioquímicos indican que VEGF bovino es una proteína dimérica con una masa molecular aparente de aproximadamente 45.000 Dalton, y con una especificidad mitogénica aparente para células del endotelio vascular. El ADN que codifica VEGF bovino se aisló explorando una biblioteca de ADNc preparada a partir de dichas células, usando oligonucleótidos basados en la secuencia de aminoácidos amino-terminal de la proteína como sondas de hibridación.

30

35

El VEGF humano se obtuvo explorando primero una biblioteca de ADNc preparada a partir de células humanas, usando el ADNc de VEGF bovino como sonda de hibridación. Un ADNc identificado de este modo codifica una proteína de 165 aminoácidos que tiene más del 95% de homología con VEGF bovino, mencionándose dicha proteína como VEGF humano (hVEGF). La actividad mitogénica de VEGF humano se confirmó expresando el ADNc de VEGF humano en células hospedadoras de mamífero. Los medios condicionados por células transfectadas con el ADNc de VEGF humano promovieron la proliferación de células del endotelio capilar, mientras que las células de control no. Véase, Leung, et al., *Science* 246:1306 (1989).

40

45

Se identificaron varios ADNc adicionales en bibliotecas de ADNc humano que codifican isoformas de 121, 189, y 206 aminoácidos de hVEGF (también mencionadas colectivamente como proteínas relacionadas con hVEGF). La proteína de 121 aminoácidos difiere de hVEGF debido a la delección de los 44 aminoácidos entre los restos 116 y 159 en hVEGF. La proteína de 189 aminoácidos difiere de hVEGF debido a la inserción de 24 aminoácidos en el resto 116 en hVEGF, y aparentemente es idéntica al factor de permeabilidad vascular humano (hVPF). La proteína de 206 aminoácidos difiere de hVEGF debido a una inserción de 41 aminoácidos en el resto 116 en hVEGF. Houck, et al., *Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991); Ferrara, et al., *J. Cell. Biochem.* 47:211 (1991); Ferrara, et al., *Endocrine Reviews* 13:18 (1992); Keck, et al., *Science* 246:1309 (1989); Connolly, et al., *J. Biol. Chem.* 246:20017 (1989); Keck, et al., *Publicación de Patente EPO N° 0 370 989* (publicada el 30 de mayo de 1990).

50

55

Los receptores para VEGF se han descrito en la bibliografía. Se ha descubierto que dos de dichos receptores, flt-1 y flk-1, median los efectos de VEGF [DeVries et al., *Science* 255:989 (1992); Shibuya et al., *Oncogene* 5:519 (1990); Matthews et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:9026 (1991); Terman et al., *Oncogene* 6:1677 (1991); Terman et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579 (1992); Neufeld et al., *Prog. Growth Factor Res.* 5:89-97 (1994); Waltenberger et al., *J. Biol. Chem.* 269:26988 (1994); Quinn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:7533 (1991)], pero su regulación y mecanismos aún no se entienden completamente. Lennmyr et al., *J. Neuropathology and Exp. Neurology* 57:874-882 (1998). Ambos receptores flt-1 y flk-1 son receptores de membrana y pertenecen a la familia del receptor tirosina quinasa clase III. Barleon et al., *J. Cell Biochem.* 54:56 (1994); Neufeld et al., *supra*.

60

65

VEGF no sólo estimula la proliferación de células del endotelio vascular, sino que también induce la angiogénesis. La angiogénesis, que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio preexistente, es un componente importante de una diversidad de enfermedades y trastornos incluyendo crecimiento tumoral y metástasis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, glaucoma

neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, hemangiomas, rechazo inmune de tejido corneal transplantado y otros tejidos, e inflamación crónica.

5 En el caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar alimento al crecimiento del tumor sólido. Folkman, et al., *Nature* 339:58 (1989). La angiogénesis también permite a los tumores que estén en contacto con el lecho vascular del hospedador que puede proporcionar una vía para la metástasis de las células tumorales. Se proporciona una evidencia del papel de la angiogénesis en la metástasis tumoral, por ejemplo, por estudios que muestran la correlación entre la cantidad y densidad de microvasos en secciones histológicas de carcinoma de mama humano invasivo y la presencia real de metástasis distante. Weidner, et al., *New Engl. J. Med.* 324:1 (1991).

15 También se ha informado de que VEGF está implicado en la permeabilidad endotelial y vascular. Véase, Ferrara et al., *Endocrine Reviews* 18:4-25 (1997); Dobrogowska et al., *J. Neurocytology* 27:163 (1998). Aunque no se entiende completamente, se cree que VEGF aumenta la filtración de las células endoteliales en la piel, retina, y tejidos tumorales. Collins et al., *Brit. J. Pharmacology* 109:195 (1993); Connolly et al., *J. Clin. Invest.* 84:1470 (1989); Sheweiki et al., *Nature* 359:843 (1992); Monacci et al., *Am. J. Physiol.* 246:C995 (1993); Stone et al., *J. Neurosci.* 15:4738 (1995); Detmar et al., *J. Invest. Dermatol.* 108:263 (1997); Weindel et al., *Neurosurgery* 35:437 (1994). También se han examinado los efectos potenciales y el papel de VEGF (y sus receptores, particularmente, el receptor flt-1), sobre las células endoteliales y la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro. Véase, por ejemplo, 20 Rosenstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:7086 (1998); Dobrogowska, supra; Kovacs et al., *Stroke* 27:1865 (1996). Se ha observado expresión de ARNm de VEGF relativamente difusa en cerebro de rata adulta pero a abundancia algo baja. Monacci et al., *Am. J. Physiol.* 146:368-378 (1993). Sin embargo, se ha demostrado que la tensión de oxígeno reducida desencadena la expresión de VEGF [Dor and Keshet, *Trends in Cardiovascular Med.*, 7:289-294 (1998)] y se ha demostrado que se encuentran niveles potenciados de VEGF, flt-1, y flk-1 en cerebro de rata después de la inducción de isquemia cerebral focal. Hayashi et al., *Stroke* 28:2039 (1997); Kovacs et al., supra; 25 Lennmyr et al., *J. Neuropathology and Experimental Neurology*, 57:874 (1998). El papel de VEGF en la patogénesis de apoplejía y fallo BBB ha sido poco claro con observaciones experimentales contradictorias mencionadas en la bibliografía. Por ejemplo, Nag et al., *J. Neuropathology and Experimental Neurology* 56:912 (1997), en su modelo de lesión cortical por frío, demostraron la presencia de VEGF murino en los vasos piales permeables y arteriolas en el tejido dañado y, a partir de esta observación, se dedujo que VEGF es uno de varios factores que puede mediar el fallo BBB y la formación de edema. Por otra parte, en Hayashi et al., *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18:887 (1998), se informa de que VEGF en sí mismo, cuando se aplicó por vía tópica a la superficie de un cerebro de rata con reperusión después de oclusión transitoria de la arteria cerebral, redujo el daño cerebral isquémico, volumen de infarto y formación de edema.

35 El documento WO 94/10202 (D1) describe antagonistas de VEGF y expone que los antagonistas son útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por proliferación de células endoteliales o neovascularización no deseable o excesiva.

40 El documento WO 98/16551 (D2) describe antagonistas de VEGF y expone que los antagonistas son útiles para el tratamiento de indicaciones donde se desea la modulación del crecimiento de células endoteliales y angiogénesis. El documento WO 00/29584 (D6), que coincide en los términos del Artículo 54(3) EPC, describe antagonistas de VEGF y expone que los antagonistas son útiles para el tratamiento de afecciones neoplásicas y no neoplásicas.

45 Sumario de la Invención

La presente invención proporciona el uso de un antagonista de hVEGF como se define en las reivindicaciones en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir edema asociado con apoplejía isquémica en un mamífero.

50 Las realizaciones adicionales de la invención son como se describe en las reivindicaciones 2-12.

Breve Descripción de los Dibujos

55 La Figura 1 muestra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hVEGF (A4.6.1 o B2.6.2) o un anticuerpo anti-factor de crecimiento de hepatocitos irrelevante (anti-HGF) en la unión de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF a hVEGF.

La Figura 2 muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF (A4.6.1 o B2.6.2) o un anticuerpo anti-HGF irrelevante en la actividad biológica de hVEGF en cultivos de células del endotelio capilar de la corteza suprarrenal (ACE) bovinas.

60 La Figura 3 muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF (A4.6.1, B2.6.2, o A2.6.1) en la unión de hVEGF a células ACE bovinas.

La Figura 4 muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre la velocidad de crecimiento de tumores NEG55 en ratones.

La Figura 5 muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre el tamaño de tumores NEG55 en ratones después de cinco semanas de tratamiento.

La Figura 6 muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 (Ab VEGF) sobre el crecimiento de tumores SK-LMS-1 en ratones.

5 La Figura 7 muestra el efecto de dosis variadas de tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 (Ab VEGF) sobre el crecimiento de tumores A673 en ratones.

La Figura 8 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre el crecimiento y supervivencia de células de glioblastoma NEG55 (G55) en cultivo.

10 La Figura 9 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre el crecimiento y supervivencia de células de rhabdomyosarcoma A673 en cultivo.

La Figura 10 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre la quimiotaxis de células endoteliales humanas inducida por fluido sinovial humano.

La Figura 11 muestra el efecto del tratamiento con flt-IgG sobre el alcance del tejido edematoso representado por una intensidad de señal elevada en la imagen de MR ponderada-T2.

15 La Figura 12 muestra imágenes de MR ponderadas-T2 representativas registradas 24 horas después de la aparición de isquemia para el grupo tanto de control (panel superior) como de tratamiento (panel inferior), mostrando reducción del tejido edematoso en el grupo de tratamiento.

La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento con flt-IgG sobre el tamaño de infarto determinado usando MRI anatómica de alta resolución 8-12 semanas después de la aparición de isquemia.

20 Las Figuras 14A-B muestran un alineamiento de las secuencias de aminoácidos para los dominios variables de la cadena ligera y pesada respectivamente de anticuerpos anti-VEGF de afinidad madurada en comparación con el anticuerpo F(ab)-12 (SEC.ID.Nº 1 mostrada en la Figura 14A; SEC.ID.Nº 9 mostrada en la Figura 14B). Los CDR están subrayados y denominados por L, cadena ligera, o H, pesada, y los números 1-3. Las secuencias de afinidad madurada se denominan YO243-1 (SEC.ID.Nº 2 mostrada en la Figura 14A; SEC.ID.Nº 10 mostrada en la Figura 14B); YO238-3 (SEC.ID.Nº 3 mostrada en la Figura 14A; SEC.ID.Nº 11 mostrada en la Figura 14B); YO313-1 (SEC.ID.Nº 4 mostrada en la Figura 14A; SEC.ID.Nº 12 mostrada en la Figura 14B); e YO317 (SEC.ID.Nº 5 mostrada en la Figura 14A; SEC.ID.Nº 13 mostrada en la Figura 14B). Las diferencias a partir F(ab)-12 se muestran en recuadros sombreados.

30 Las Figuras 15A-B muestran un alineamiento de las secuencias de aminoácidos para los dominios variables de la cadena ligera y pesada respectivamente de anticuerpos anti-VEGF de afinidad madurada en comparación con el anticuerpo F(ab)-12 (SEC.ID.Nº 1 mostrada en las Figuras 14A y 15A; SEC.ID.Nº 9 mostrada en las Figuras 14B y 15B). Los CDR están subrayados y denominados por L, cadena ligera, o H, pesada, y los números 1-3. Las secuencias de afinidad madurada se denominan YO192 (SEC.ID.Nº 6 mostrada en la Figura 15A; SEC.ID.Nº 14 mostrada en la Figura 15B); YO238-3 (SEC.ID.Nº 3 mostrada en las Figuras 14A y 14B; SEC.ID.Nº 11 mostrada en las Figuras 14B y 15B); YO239-19 (SEC.ID.Nº 7 mostrada en la Figura 15A; SEC.ID.Nº 15 mostrada en la Figura 15B); e YO313-2 (SEC.ID.Nº 8 mostrada en la Figura 15A; SEC.ID.Nº 16 mostrada en la Figura 15B). Las diferencias de F(ab)-12 se muestran en recuadros sombreados.

40 Descripción Detallada de la Invención

45 La presente invención proporciona la fabricación de medicamentos que contienen antagonistas de hVEGF que son capaces de inhibir, secuestrar, o neutralizar una o más de las actividades biológicas de hVEGF. Los antagonistas de hVEGF funcionan impidiendo la unión de hVEGF a un receptor celular. Por tanto, se incluyen en el alcance de la invención anticuerpos, anticuerpos monoclonales y anticuerpos humanizados, o fragmentos de los mismos, que se unen a hVEGF, o al receptor de hVEGF. También se incluyen en el alcance de la invención fragmentos y variantes de la secuencia de aminoácidos de hVEGF que se unen al receptor de hVEGF pero que no muestran una actividad biológica de hVEGF nativo. También se incluyen en el alcance de la invención el receptor de hVEGF y fragmentos y variantes de la secuencia de aminoácidos del mismo que son capaces de unirse a hVEGF.

50 El término "hVEGF" como se usa en este documento se refiere al factor de crecimiento celular del endotelio vascular humano de 165 aminoácidos, y los factores de crecimiento celular del endotelio vascular relacionados de 121, 189, y 206 aminoácidos, como se describe por Leung, et al., *Science* 246:1306 (1989), y Houck, et al., *Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de esos factores de crecimiento.

55 El término "receptor de hVEGF" o "hVEGFr" como se usa en este documento se refiere a un receptor celular para hVEGF, generalmente un receptor de superficie celular que se encuentra en las células del endotelio vascular, así como fragmentos y variantes del mismo que mantienen la capacidad de unirse a hVEGF. Típicamente, los receptores de hVEGF y fragmentos y variantes de los mismos que son antagonistas de hVEGF estarán en forma aislada, en lugar estar integrados en una membrana celular o fijados a una superficie celular como puede ser el caso en la naturaleza. Un ejemplo de un receptor de hVEGF es el fms-tipo tirosina quinasa (flt o flt-1), un receptor transmembrana de la familia tirosina quinasa. DeVries, et al., *Science* 255:989 (1992); Shibuya, et al., *Oncogene* 5:519 (1990). El receptor flt de longitud completa comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. El dominio extracelular está implicado en la unión a hVEGF, mientras que el dominio intracelular está implicado en la transducción de señal.

65

Otro ejemplo de un receptor de hVEGF es el receptor flk-1 (también mencionado como KDR). Matthews, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 88:9026 (1991); Terman, et al., Oncogene 6:1677 (1991); Terman, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:1579 (1992).

- 5 La unión de hVEGF al receptor flt da como resultado la formación de al menos dos complejos de alto peso molecular, que tienen un peso molecular aparente de 205.000 y 300.000 Dalton. Se cree que el complejo de 300.000 Dalton es un dímero que comprende dos moléculas de receptor unidas a una única molécula de hVEGF.

10 Las variantes de hVEGFr también se incluyen en el alcance del mismo. Los ejemplos representativos incluyen formas truncadas de un receptor en el que al menos los dominios transmembrana y citoplásmico están deletados de la molécula de receptor de longitud completa, y proteínas de fusión en las que se conjugan polímeros o polipéptidos no hVEGFr con hVEGFr o, preferiblemente, formas truncadas del mismo. Un ejemplo de dicho polipéptido no hVEGF es una inmunoglobulina. En ese caso, por ejemplo, se sustituye una secuencia del dominio extracelular del hVEGFr por el dominio Fv de la cadena ligera o (preferiblemente) pesada de una inmunoglobulina, con el extremo C-terminal del dominio extracelular del receptor unido covalentemente al extremo amino terminal del CH1, bisagra, CH2 u otro fragmento de la cadena pesada. Dichas variantes se hacen del mismo modo que las inmunoadhesinas conocidas. Véase por ejemplo, Gascoigne, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84:2936 (1987); Capon, et al., Nature 337:525 (1989); Aruffo, et al., Cell 61:1303 (1990); Ashkenazi, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 88:10535 (1991); Bennett, et al., J. Biol. Chem. 266:23060 (1991). Los ejemplos de diversas proteínas de fusión flt-IgG se describen en el Ejemplo 3 a continuación. Las formas truncadas del dominio extracelular del receptor de hVEGF contempladas para su uso en la invención incluyen fragmentos ECD (por ejemplo, que tienen uno o más aminoácidos en la secuencia ECD deletados) y formas ECD que tienen uno o más dominios tipo inmunoglobulina en el ECD deletados. El ejemplo 3B describe, por ejemplo, una forma ECC truncada que incluye sólo los primeros tres dominios tipo inmunoglobulina de flt fusionados a un Fc-IgG. Preferiblemente, una forma truncada del ECD usada para hacer una molécula antagonista incluirá suficientes dominios tipo inmunoglobulina para asegurar una unión deseada a hVEGF.

30 En otras realizaciones, el hVEGFr o fragmentos o variantes del mismo se conjugan con un polímero no proteico tal como polietilenglicol (PEG) (véase, por ejemplo, Davis, et al., Patente de Estados Unidos N° 4.179.337; Goodson, et al., BioTechnology 8:343-346 (1990); Abuchowski, et al., J. Biol. Chem. 252:3578 (1977); Abuchowski, et al., J. Biol. Chem. 252:3582 (1977)) o carbohidratos (véase, por ejemplo, Marshall, et al., Arch. Biochem. Biophys., 167:77 (1975)). Esto puede servir para prolongar la vida media biológica del hVEGFr y reducir la posibilidad de que el receptor sea inmunogénico en el mamífero al que se administra.

35 El hVEGFr se usa sustancialmente de la misma manera que los anticuerpos frente a hVEGF, teniendo en cuenta la afinidad del antagonista y su valencia para hVEGF. Es especialmente útil una secuencia del dominio extracelular del receptor de hVEGF, por sí mismo o fusionado a un polipéptido de inmunoglobulina u otro polipéptido de vehículo, como antagonista de hVEGF, debido a su capacidad para secuestrar hVEGF que está presente en un hospedador pero que no se une a hVEGF en una superficie celular.

40 hVEGFr y fragmentos y variantes del mismo también son útiles en ensayos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de hVEGF. Por ejemplo, las células hospedadoras transfectadas con ADN que codifica hVEGFr (por ejemplo, flt o flk-1) sobre-expresan el polipéptido receptor en la superficie celular, haciendo a dichas células hospedadoras recombinantes apropiadas de manera ideal para analizar la capacidad de un compuesto de ensayo (por ejemplo, una molécula pequeña, péptido lineal o cíclico, o polipéptido) de unirse a hVEGFr. Las proteínas hVEGFr y hVEGFr de fusión, tales como una proteína de fusión hVEGFr-IgG, pueden usarse de un modo similar. Por ejemplo, la proteína de fusión se une a un soporte inmovilizado y se determina la capacidad de un compuesto de ensayo de desplazar hVEGF radiomarcado del dominio hVEGFr de la proteína de fusión.

50 El término "recombinante" usado con referencia a hVEGF, receptor de hVEGF, anticuerpos, u otras proteínas, se refiere a proteínas que se producen por expresión de ADN recombinante en una célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser procariota (por ejemplo, una célula bacteriana tal como E. coli) o eucariota (por ejemplo, una célula de levadura o de mamífero).

55 Anticuerpos Antagonistas

60 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos en especificidad y afinidad excepto para posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Debe apreciarse que como resultado de dichas mutaciones de origen natural y similares, una composición de anticuerpos monoclonales de la invención, que contendrá predominantemente anticuerpos capaces de unirse específicamente a hVEGF o hVEGFr, también puede contener cantidades minoritarias de otros anticuerpos.

Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de dicha población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se entiende como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, pueden fabricarse anticuerpos monoclonales de la presente invención usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler & Milstein, *Nature* 256:495 (1975), o pueden fabricarse por métodos de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Cabilly, et al., Patente de Estados Unidos N° 4.816.597.

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado se inmuniza con antígeno por vía subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína o proteínas usadas para inmunización. Como alternativa, pueden inmunizarse linfocitos in vitro. Después los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión apropiado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986).

El antígeno puede ser hVEGF o hVEGFr. El antígeno opcionalmente es un fragmento o porción o variante de uno cualquiera de hVEGF o hVEGFr que tiene uno o más restos de aminoácidos que participan en la unión de hVEGF a uno de sus receptores. Por ejemplo, la inmunización con una secuencia de dominio extracelular de un hVEGFr (tal como, un polipéptido hVEGFr truncado que carece de al menos los dominios transmembrana e intracelular) será especialmente útil para producir anticuerpos que son antagonistas de hVEGF, ya que la región o regiones del dominio extracelular son las que están implicadas en la unión de hVEGF.

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo apropiado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma no fusionadas parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), que evitan, dichas sustancias, el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, mantienen un alto nivel de expresión estable del anticuerpo por las células que producen anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre otras, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las obtenidas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, células SP-2 disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA, y células P3X63Ag8U.1 descritas por Yelton, et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81:1 (1978). También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur, et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente de enzimas unidas (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquéllos que inmunoprecipitan de manera preferente hVEGF o hVEGFr, o que unen de manera preferente al menos uno de esos antígenos en un ensayo de unión, y que son capaces de inhibir una actividad biológica de hVEGF.

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos antagonistas de la especificidad, afinidad, y actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer por métodos convencionales. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-104 (Academic Press, 1986). Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer in vivo como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan apropiadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se coloca en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN opcionalmente puede modificarse para cambiar el carácter de la inmunoglobulina producida por su expresión. Por ejemplo, las formas humanizadas de anticuerpos murinos se producen sustituyendo una región

- determinante de complementariedad (CDR) del dominio variable del anticuerpo murino por la región correspondiente de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, los restos de aminoácidos de la región flanqueante (FR) seleccionados del anticuerpo murino también se sustituyen por los restos de aminoácidos correspondientes en el anticuerpo humano. Carter, et al., Proc. Nat. Sci. 89:4285 (1992); Carter, et al., BioTechnology 10:163 (1992). Las formas quiméricas de anticuerpos murinos también se producen sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos seleccionados en lugar de las secuencias murinas homólogas. Cabilly, et al., Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984).
- Los anticuerpos humanizados particulares contemplados para su uso en la presente invención incluyen los anticuerpos anti-hVEGF humanizados y de afinidad madurada descritos en las solicitudes PCT publicadas WO 98/45331 (publicada el 15 de octubre de 1998) y WO 98/45332 (publicada el 15 de octubre de 1998). Dichos anticuerpos anti-VEGF humanizados o de afinidad madurada pueden prepararse o fabricarse usando métodos y técnicas descritos en el documento WO 98/45331 y el documento WO 98/45332. Preferiblemente, el anticuerpo anti-hVEGF comprende el F(ab) humanizado, denominado como F(ab)-12, o el anticuerpo de afinidad madurada, denominado como YO317, en las solicitudes PCT mencionadas anteriormente. Las figuras 14A-B y 15A-B ilustran las secuencias de aminoácidos (cadenas ligera y pesada) para estos anticuerpos anti-VEGF, junto con otros anticuerpos anti-VEGF de afinidad madurada, denominados como YO192; YO238-3; YO239-19; YO313-2; YO243-1; e YO313-1. Todos estos anticuerpos anti-VEGF se contemplan para su uso en los métodos descritos en este documento. Como se *describe* en estas solicitudes PCT publicadas, se demostró que varios de los anticuerpos humanizados y de afinidad madurada reducían o inhibían la actividad VEGF en diferentes tipos de ensayos in vitro, y por tanto funcionan como antagonistas de VEGF.
- Los anticuerpos incluidos en el alcance de la invención incluyen, por tanto, anticuerpos variantes, tales como anticuerpos quiméricos (incluyendo "humanizados") y anticuerpos híbridos que comprenden cadenas de inmunoglobulina capaces de unir hVEGF o hVEGF_r, y un epítipo no hVEGF.
- Los anticuerpos de este documento incluyen todas las especies de origen, y clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) y subclases de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv), mientras que sean capaces de unir hVEGF o hVEGF_r, y sean capaces de antagonizar una actividad biológica de hVEGF.
- En una realización preferida de la invención, el anticuerpo tendrá una afinidad por el antígeno inmunizante de al menos aproximadamente 10⁹ litros/mol, como se determina, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980). Además, el anticuerpo monoclonal típicamente inhibirá la actividad mitogénica o angiogénica de hVEGF al menos al 50%, preferiblemente más del 80%, y más preferiblemente más del 90%, como se determina, por ejemplo, por un ensayo de supervivencia o proliferación celular in vitro, tal como se describe en el Ejemplo 2 o como se describe en el documento WO 98/45331 y el documento WO 98/45332.
- Para algunas aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, es deseable que el anticuerpo monoclonal sea reactivo con no todas las diferentes formas moleculares de hVEGF. Por ejemplo, puede ser deseable tener un anticuerpo monoclonal que sea capaz de unirse específicamente a hVEGF de 165 aminoácidos de secuencia pero no a los polipéptidos hVEGF de 121 o 189 aminoácidos de secuencia. Dichos anticuerpos se identifican fácilmente por ensayos ELISA comparativos o inmunoprecipitación comparativa de los diferentes polipéptidos hVEGF.
- Conjugados con Restos Citotóxicos
- En algunas realizaciones es deseable proporcionar un resto citotóxico conjugado con un anticuerpo monoclonal específico de hVEGF o con hVEGF_r. En estas realizaciones la citotoxina sirve para incapacitar o eliminar células que están expresando o uniendo hVEGF o su receptor. El conjugado se dirige a la célula por el dominio que es capaz de unirse a hVEGF o hVEGF_r. Por tanto, los anticuerpos monoclonales que son capaces de unir hVEGF o hVEGF_r, se conjugan con citotoxinas. De manera similar, hVEGF_r se conjugan con una citotoxina. Aunque los anticuerpos monoclonales son capaces de neutralizar de manera óptima la actividad de hVEGF solos (sin la citotoxina), no es necesario en esta realización que el anticuerpo monoclonal o receptor sea capaz de algo más que unirse a hVEGF o hVEGF_r.
- Típicamente, la citotoxina es una citotoxina proteica, por ejemplo, la toxina de la difteria, ricino o de Pseudomonas, aunque en el caso de ciertas clases de inmunoglobulinas el dominio Fc del anticuerpo monoclonal en sí mismo puede servir para proporcionar la citotoxina (por ejemplo, en el caso de anticuerpos IgG2, que son capaces de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)). Sin embargo, la citotoxina no necesita ser proteica y puede incluir agentes quimioterapéuticos empleados hasta ahora, por ejemplo, para el tratamiento de tumores.
- La citotoxina típicamente se une a un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo mediante un enlace amida central en (o en lugar de parte o todo) el dominio Fc del anticuerpo. Cuando se proporciona la función diana por hVEGF_r, el resto citotóxico se sustituye en cualquier dominio del receptor que no participe en la unión de hVEGF;

preferiblemente, el resto se sustituye en lugar de o sobre los dominios transmembrana y/o citoplásmico del receptor. El sitio óptimo de sustitución se determinará por experimentación de rutina y pertenece a la especialidad de la técnica.

5 Los conjugados que son fusiones proteicas se fabrican fácilmente en cultivo de células recombinantes expresando un gen que codifica el conjugado. Como alternativa, los conjugados se fabrican entrecruzando de manera covalente el resto citotóxico con la cadena lateral de un resto de aminoácido o el carboxilo C-terminal del anticuerpo o el receptor, usando métodos conocidos per se tales como intercambio de disulfuro o unión a través de un enlace tioéster usando, por ejemplo, iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimadato.

10 Conjugados con otros Restos

Los anticuerpos monoclonales y hVEGFr que son antagonistas de hVEGF también se pueden conjugar con sustancias que no se pueden clasificar fácilmente como citotoxinas en su propio sentido, pero que aumentan la actividad de las composiciones de este documento. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o hVEGFr capaces de unirse a hVEGF, o hVEGFr se fusionan con polipéptidos heterólogos, tales como secuencias virales, con receptores celulares, con citoquinas tales como TNF, interferones, o interleuquinas, con polipéptidos que tienen actividad procoagulante, y con otros polipéptidos biológica o inmunológicamente activos. Dichas fusiones se hacen fácilmente por métodos recombinantes.

20 Típicamente, el dominio o dominios constantes de un anticuerpo anti-hVEGF o el dominio transmembrana y/o intracelular de un hVEGFr se sustituyen por dichos polipéptidos de no inmunoglobulina. Como alternativa, se sustituye un dominio variable de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti-hVEGF descrito en este documento.

25 En realizaciones preferidas, dichos polipéptidos de no inmunoglobulina se unen a o se sustituyen en los dominios constantes de un anticuerpo descrito en este documento. Bennett, et al., J. Biol. Chem. 266:23060-23067 (1991). Como alternativa, se sustituye el Fv de un anticuerpo de este documento para crear un anticuerpo polivalente quimérico que comprende al menos un sitio de unión a antígeno restante que tiene especificidad por hVEGF o hVEGFr, y un sitio de unión a antígeno sustituto que tiene una función o especificidad distinta de la del anticuerpo de partida.

Anticuerpos Heteroespecíficos

35 Los anticuerpos monoclonales capaces de unirse a hVEGF, o hVEGFr sólo necesitan contener un único sitio de unión para los epítomos enumerados, típicamente un único complejo de cadena pesada-ligera o fragmento del mismo. Sin embargo, dichos anticuerpos opcionalmente también albergan dominios de unión a antígeno que son capaces de unir un epítomo no encontrado en ninguno cualquiera de hVEGF o hVEGFr. Por ejemplo, sustituyendo la secuencia de aminoácidos o los restos de aminoácidos correspondientes de un anticuerpo anti-hVEGF o hVEGFr nativo con los restos determinantes de complementariedad y, si es necesario, los flanqueantes, de un anticuerpo que tiene especificidad por un antígeno distinto de hVEGF o hVEGFr se creará un anticuerpo poliespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno que tiene especificidad por hVEGF o hVEGFr, y otro sitio de unión a antígeno que tiene especificidad por el antígeno no hVEGF o hVEGFr. Estos anticuerpos son al menos bivalentes, pero pueden ser polivalentes, dependiendo de la cantidad de sitios de unión a antígeno que tenga la clase de anticuerpo elegida. Por ejemplo, los anticuerpos de la clase IgM serán polivalentes.

50 En realizaciones preferidas de la invención dichos anticuerpos son capaces de unir un epítomo hVEGF o hVEGFr y (a) un polipéptido activo en la coagulación sanguínea, tal como proteína C o factor tisular, (b) una proteína citotóxica tal como factor de necrosis tumoral (TNF), o (c) un receptor de superficie celular no hVEGFr, tal como CD4, o receptor HER-2 (Maddon, et al., Cell 42:93 (1985); Coussens, et al., Science 230:1137 (1985)). Los anticuerpos heteroespecíficos multivalentes se fabrican adecuadamente cotransformando una célula hospedadora con ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de ambos anticuerpos y recuperando después, por cromatografía de inmutafinidad o similares, la proporción de anticuerpos expresados que tiene las propiedades de unión a antígeno deseadas. Como alternativa, dichos anticuerpos se fabrican por recombinación in vitro de anticuerpos monoespecíficos.

Anticuerpos Monovalentes

60 Los anticuerpos monovalentes capaces de unirse a hVEGFr son especialmente útiles como antagonistas de hVEGF. Sin limitar la invención a ningún mecanismo particular de actividad biológica, se cree que la activación de receptores de hVEGF celulares procede por un mecanismo donde la unión de hVEGF a receptores de hVEGF celulares induce la agregación de los receptores, y a su vez activa la actividad quinasa intracelular del receptor. Como los anticuerpos anti-receptor de hVEGF monovalentes no pueden inducir dicha agregación, y por lo tanto no pueden activar el receptor de hVEGF por ese mecanismo, son antagonistas ideales de hVEGF.

65

Debe apreciarse, sin embargo, que estos anticuerpos deben estar dirigidos frente al sitio de unión a hVEGF del receptor o deben ser capaces de impedir de otro modo la unión de hVEGF al receptor de hVEGF, tal como impidiendo estéricamente el acceso de hVEGF al receptor. Como se describe en otra parte en este documento, sin embargo, los anticuerpos anti-hVEGFr que no son capaces de impedir la unión de hVEGF son útiles cuando se conjugan con restos de no inmunoglobulina, por ejemplo, citotoxinas.

Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada generalmente está truncada en cualquier punto de la región Fc para evitar el entrecruzamiento de la cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína relevantes se sustituyen con otro resto de aminoácido o se delecionan para evitar el entrecruzamiento. También son apropiados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, se preparan fragmentos Fab por escisión enzimática de anticuerpo intacto.

Variantes Antagonistas de hVEGF

Además de los anticuerpos descritos en este documento, otros antagonistas útiles de hVEGF incluyen fragmentos y variantes de la secuencia de aminoácidos de hVEGF nativo que se unen al receptor de hVEGF pero que no muestran la actividad biológica de hVEGF nativo. Por ejemplo, dichos antagonistas incluyen fragmentos y variantes de la secuencia de aminoácidos que comprenden un dominio de unión al receptor de hVEGF, pero que carecen de un dominio que confiere actividad biológica, o que son deficientes de otro modo en la activación de los receptores de hVEGF celulares, tal como en el caso de un fragmento o una variante de la secuencia de aminoácidos que es deficiente en su capacidad para inducir la agregación o activación de receptores de hVEGF celulares. El término “dominio de unión al receptor” se refiere a las secuencias de aminoácidos en hVEGF que están implicadas en la unión al receptor de hVEGF. El término “dominio de actividad biológica” o “dominio que confiere actividad biológica” se refiere a una secuencia de aminoácidos en hVEGF que confiere actividad biológica particular del factor, tal como actividad mitogénica, angiogénica, o de permeabilidad vascular.

La observación de que hVEGF parece ser capaz de formar un complejo con dos o más moléculas hVEGFr en la superficie de un célula sugiere que hVEGF tiene al menos dos sitios discretos para la unión a hVEGFr y que se une a dichos receptores celulares de un modo secuencial, primero a un sitio y después al otro antes de que suceda la activación, del modo de la hormona de crecimiento, prolactina y similares (véase, por ejemplo, Cunningham, et al., *Science* 254:821 (1991); deVos, et al., *Science* 255:306 (1992); Fuh, et al., *Science* 256:1677 (1992)). Por consiguiente, se seleccionan variantes antagonistas de hVEGF en las que un sitio de unión al receptor de hVEGF (típicamente el sitio implicado en la unión inicial de hVEGF a hVEGFr) permanece sin modificar (o si se modifica se varía para potenciar la unión), mientras que típicamente se modifica un segundo sitio de unión al receptor de hVEGF por sustitución o sustituciones o delección o delecciones de restos de aminoácidos conservativas para volver a ese sitio de unión inoperante.

Los dominios de unión al receptor en hVEGF y los dominios de unión a hVEGF en hVEGFr se determinan por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo estudios de rayos X, análisis mutacionales, y estudios de unión a anticuerpo. Los enfoques mutacionales incluyen las técnicas de mutagénesis por saturación aleatoria acopladas a selección de mutantes de escape, y mutagénesis por inserción. Otra estrategia apropiada para identificar los dominios de unión al receptor en ligandos es conocida como mutagénesis por exploración de alanina (Ala). Cunningham, et al., *Science* 244, 1081-1985 (1989). Este método implica la identificación de regiones que contienen cadenas laterales de aminoácidos cargados. Los restos cargados en cada región identificados (es decir, Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se reemplazan (una región por molécula mutante) con Ala y se ensaya la unión al receptor de los ligandos obtenidos, para evaluar la importancia de la región particular en la unión al receptor. Un método poderoso adicional para la localización de los dominios de unión al receptor es a través del uso de anticuerpos anti-hVEGF neutralizantes. Kim, et al., *Growth Factors* 7:53 (1992). Habitualmente se usa una combinación de estos y métodos similares para la localización de los dominios implicados en la unión al receptor.

El término “variante de secuencia de aminoácidos” usado con referencia a hVEGF se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto punto de las secuencias de aminoácidos de las formas nativas de hVEGF. Habitualmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos antagonistas tendrán al menos aproximadamente un 70% de homología con al menos un dominio de unión al receptor de un hVEGF nativo, y preferiblemente, serán al menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% homólogos con el dominio de unión al receptor de un hVEGF nativo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos tienen sustituciones, delecciones, y/o inserciones en ciertas posiciones en la secuencia de aminoácidos de hVEGF nativo, de modo que las variantes mantengan la capacidad de unirse al receptor de hVEGF (y por tanto compiten con hVEGF nativo por la unión al receptor de hVEGF) pero no logran indicar uno o más de los efectos biológicos de hVEGF, tal como proliferación celular del endotelio, angiogénesis, o permeabilidad vascular.

“Homología” se define como el porcentaje de restos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos a los restos en la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión al receptor de un hVEGF nativo después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología y sin

considerar ninguna sustitución conservativa como parte del porcentaje de homología de aminoácidos. Los métodos y programas informáticos para el alineamiento son bien conocidos en la técnica. Uno de dichos programas informáticos es "Align 2", creado por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991. Los especialistas en la técnica pueden determinar, usando técnicas de rutina, parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud de las secuencias que se están comparando.

Las variantes de sustitución son aquéllas que tienen al menos un resto de aminoácido en una secuencia nativa retirado y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición. Las sustituciones pueden ser únicas, donde sólo un aminoácido en la molécula se ha sustituido, o pueden ser múltiples, donde dos o más aminoácidos se han sustituido en la misma molécula.

Las variantes de inserción son aquéllas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en la secuencia nativa. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa que está conectado al grupo funcional α -carboxi o α -amino del aminoácido.

Las variantes de delección son aquéllas con uno o más restos de aminoácido retirados en una secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de delección tendrán uno o dos restos de aminoácido deleccionados en una región particular de la molécula.

Los fragmentos y variantes de la secuencia de aminoácidos de hVEGF se preparan fácilmente por métodos conocidos en la técnica, tal como por mutagénesis dirigida de sitio del ADN que codifica el factor nativo. El ADN mutado se inserta en un vector de expresión apropiado, y después se transfectan las células hospedadoras con el vector recombinante. Las células hospedadoras recombinantes se hacen crecer en un medio de cultivo apropiado, y el fragmento deseado o variante de la secuencia de aminoácidos expresado en las células hospedadoras se recupera después del cultivo celular recombinante por métodos cromatográficos u otros métodos de purificación.

Como alternativa, los fragmentos y variantes de aminoácidos de hVEGF se preparan in vitro, por ejemplo, por proteólisis de hVEGF nativo, o por síntesis usando procedimientos de síntesis peptídica en fase sólida convencional como se describe por Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963)), aunque pueden usarse otras síntesis químicas equivalentes conocidas en la técnica. La síntesis en fase sólida se inicia a partir del extremo C-terminal del péptido acoplado un α -aminoácido protegido a una resina apropiada. Los aminoácidos se acoplan a la cadena peptídica usando técnicas bien conocidas en la técnica para la formación de enlaces peptídicos.

Usos Terapéuticos

Los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y "terapéutico" como se usan en este documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva.

Para aplicaciones terapéuticas, los antagonistas de la invención se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación aceptable, incluyendo las que pueden administrarse a un ser humano por vía intravenosa en forma de bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intra-cerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intradural, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se espera que la infusión intravenosa sea particularmente útil por ejemplo, en el tratamiento de edema cerebral.

Dichas formas de dosificación abarcan vehículos que son no tóxicos y no terapéuticos de manera inherente. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales, o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, y polietilenglicol. Los vehículos para formas tópicas o basadas en gel de antagonistas incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol, y ceras de alcohol de madera. Pueden usarse formas de almacenamiento convencionales. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nano-cápsulas, liposomas, parches, formas de inhalación, pulverizadores nasales, comprimidos sublinguales, y preparaciones de liberación sostenida. El antagonista típicamente se formulará en dichos vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, estando dichas matrices en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxiethyl-metacrilato) como se describe por Langer et al., J. Biomed. Mater. Res.

15:167 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982), o poli(vinilalcohol), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22:547 (1983), copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables (Langer et al., supra), de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los antagonistas polipeptídicos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Las composiciones de antagonista de hVEGF de liberación sostenida también incluyen anticuerpos antagonistas o hVEGFr atrapados en forma de liposomas. Los liposomas que contienen los antagonistas se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); Patente de Estados Unidos N° 4.485.045; Patente de Estados Unidos N° 4.544.545. Habitualmente, los liposomas son pequeños (aproximadamente 200-800 Angstroms) de tipo unilamelar en los que el contenido en lípidos es mayor del 30% en moles de colesterol, estando ajustada la proporción seleccionada para la terapia HRG óptima. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

Otro uso de la presente invención comprende incorporar un antagonista de hVEGF en artículos con forma.

Una dosificación apropiada y eficaz de antagonista dependerá del tipo de enfermedad o afección a tratar, como se define en este documento, la gravedad y curso de la enfermedad o afección, si los antagonistas se administran para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al antagonista, y la discreción del médico que está atendiendo. Una dosificación eficaz de antagonista será típicamente la cantidad de antagonista administrada para conseguir el máximo de cantidad deseada de inhibición de actividad biológica de VEGF. El antagonista se administra apropiadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

Los antagonistas de hVEGF son útiles en el tratamiento de edema asociado con apoplejía isquémica

En este documento, el término "edema" se usa en un sentido general e incluye afecciones en el cuerpo o que acompañan a apoplejía isquémica caracterizadas por un aumento en el contenido acuoso tisular extravascular, debido sólo a niveles de agua extracelular aumentados, o en combinación con niveles de agua intracelular aumentados. Un aumento en el volumen cerebral puede ser, por ejemplo, el resultado de volumen de sangre cerebral aumentado y/o contenido en agua tisular aumentado. El término "edema" usado en este documento incluye las afecciones patológicas mencionadas en la técnica como edema vasogénico y edema citotóxico. Típicamente, la afección mencionada como edema vasogénico se ha caracterizado como asociada a la alteración de la barrera sangre-cerebro (BBB) mientras que el edema citotóxico se ha caracterizado como asociado a BBB intacta. El edema cerebral se describe en líneas generales en el artículo de revisión, Hariri, Neurosurgical Intensive Care 5:687 (1994).

Se contempla que los antagonistas de hVEGF de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con otras terapias, para reducir o inhibir dicho edema en el cerebro.

Es habitual para los mamíferos que tienen o están experimentando apoplejía, desarrollar o sufrir edema cerebral. Se reconoce en la técnica que la apoplejía en un paciente puede caracterizarse o clasificarse como diversos tipos particulares de apoplejía, dependiendo por ejemplo, de la etiología o patología de la interrupción de flujo sanguíneo, los tipos de células o tejidos afectados, y la presencia de extravasación sanguínea en el tejido (tal como tejido cerebral). Los diferentes tipos de apoplejía que se han caracterizado clínicamente incluyen aunque sin limitación, apoplejía trombótica, apoplejía embólica, apoplejía hemodinámica, apoplejía lacunar, y apoplejías hemorrágicas derivadas o como resultado de hemorragia intracerebral, subaracnoidea, intraventricular, o subdural. El médico especialista apreciará fácilmente y entenderá la naturaleza de dichas afecciones de apoplejía, y será capaz de detectar y diagnosticar la presencia o síntomas de dichas afecciones en pacientes. Los métodos de la presente invención contemplan que las moléculas antagonistas de hVEGF pueden usarse en el tratamiento de apoplejía isquémica, particularmente para reducir o inhibir el edema y proteger frente al daño celular y tisular. Los antagonistas de hVEGF pueden administrarse en forma de un tratamiento agudo después de la aparición de apoplejía isquémica para reducir o inhibir por ejemplo, edema cerebral, potenciando de este modo la recuperación del mamífero de la apoplejía isquémica. El uso de los antagonistas de hVEGF es beneficioso en que el tratamiento puede prevenir o evitar tener que realizar cirugía (como una craneotomía) en el mamífero para reducir o aliviar la presión intracraneal debido al exceso de acumulación de agua en tejidos cerebrales. También se contempla que después de la reducción o prevención de dicho edema por los antagonistas de hVEGF, habrá una reducción (es

decir, efecto protector) en la cantidad de cerebro y tejido neuronal que puede estar típicamente dañado por la presión intracraneal o edema.

5 Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg de antagonista es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, por una o más administraciones por separado, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Por ejemplo, en los métodos de tratamiento de edema cerebral y apoplejía isquémica, puede ser deseable administrar el antagonista o antagonistas de hVEGF inmediatamente después de la detección o diagnóstico en el paciente, en varias horas de lesión o aparición de apoplejía, o en 1 a 4 días después de ello. El protocolo de administración deseado será típicamente de la discreción del médico. El progreso de la terapia con antagonista de hVEGF se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales, incluyendo, por ejemplo, técnicas radiográficas (en particular, formación de imágenes por resonancia magnética, MRI) formación de edema asociada a traumatismo o apoplejía isquémica, o controlando la presión intracraneal para el edema cerebral.

20 De acuerdo con otra realización de la invención, la eficacia del antagonista en la prevención o tratamiento de un afección o enfermedad puede mejorarse administrando el antagonista de manera seriada o en combinación con otro agente que es eficaz para esos propósitos, tal como factor de necrosis tumoral (TNF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ácido o básico o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades anticoagulantes del factor tisular, proteína C, o proteína S (véase Esmon, et al., Publicación de Patente PCT N° WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), un anticuerpo capaz de unirse al receptor HER2 (véase Hudziak, et al., Publicación de Patente PCT N° WO 89/06692, publicada el 27 de julio de 1989), o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes de alquilación, antagonistas de ácido fólico, antimetabolitos del metabolismo de ácidos nucleicos, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol, o corticosteroides. Dichos agentes distintos pueden estar presentes en la composición que se está administrando o pueden administrarse por separado. Particularmente en el tratamiento de edema y apoplejía isquémica, el antagonista puede administrarse de manera seriada o en combinación con agentes tales como agentes antivirales, antifúngicos o antiparasitarios, antibióticos, agentes trombolíticos (tales como t-PA), agentes de terapia osmótica (por ejemplo, manitol), o esteroides (como Decadron o prednisona). El uso de dichos agentes en combinación con el antagonista está dentro de la experiencia habitual del médico, y por supuesto, la selección de dichos agentes dependería, por ejemplo, de la enfermedad o afección que se está tratando.

35 También se contempla que el antagonista de hVEGF puede administrarse de manera seriada con hVEGF, particularmente en el tratamiento de apoplejía isquémica. Después del diagnóstico o detección de apoplejía isquémica, el antagonista de hVEGF puede administrarse inmediatamente o en aproximadamente 1 a 4 días después de la aparición de apoplejía isquémica. Se cree que después de completar la administración del antagonista para reducir o inhibir la formación de edema, puede ser beneficioso administrar al paciente una cantidad de hVEGF suficiente para estimular o promover la re-vascularización. Preferiblemente, el hVEGF sería una forma recombinante de hVEGF y se administraría en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración sólo y no pretenden limitar la invención de ningún modo.

EJEMPLOS

50 Se usaron los reactivos disponibles en el mercado a los que se hace referencia en los ejemplos de acuerdo con las instrucciones del fabricante salvo que se indique otra cosa. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y durante toda la memoria descriptiva, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

EJEMPLO 1

55 Preparación de Anticuerpos Monoclonales Anti-hVEGF

60 Para obtener hVEGF conjugado a hemocianina de lapa californiana (KLH) para inmunización, se mezcló hVEGF recombinante (165 aminoácidos), Leung, et al., Science 246:1306 (1989), con KLH a una proporción 4:1 en presencia de glutaraldehído al 0,05% y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas con agitación suave. La mezcla después se dializó frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C durante una noche. Se inmunizaron ratones balb/c cuatro veces cada dos semanas por inyecciones intraperitoneales con 5 µg de hVEGF conjugado con 20 µg de KLH, y se estimularon con la misma dosis de hVEGF conjugado con KLH cuatro días antes de la fusión celular.

Se fusionaron células de bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma P3X63Ag8U.1, Yelton, et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1 (1978), usando polietilenglicol (PEG) al 35% como se describe. Yarmush, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 77:2899 (1980). Los hibridomas se seleccionaron en medio HAT.

- 5 Los sobrenadantes de los cultivos de células de hibridoma se exploraron para la producción de anticuerpo anti-hVEGF por un ensayo ELISA usando placas de microtitulación recubiertas con hVEGF. Se determinó el anticuerpo que se unió a hVEGF en cada uno de los pocillos usando inmunoglobulina de cabra anti-IgG de ratón conjugada con fosfatasa alcalina y el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo. Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, página 597 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Las células de hibridoma determinadas de este modo
10 para producir anticuerpos anti-hVEGF se subclonaron por dilución limitante, y dos de esos clones, denominados A4.6.1 y B2.6.2, se eligieron para estudios adicionales.

EJEMPLO 2

15 Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Anti-hVEGF

A.Especificidad de Antígeno

- 20 Las especificidades de unión de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se determinaron por ELISA. Los anticuerpos monoclonales se añadieron a los pocillos de placas de microtitulación que se habían recubierto previamente con hVEGF, FGF, HGF, o factor de crecimiento epidérmico (EGF). El anticuerpo unido se detectó con inmunoglobulinas de cabra anti-IgG de ratón conjugadas con peroxidasa. Los resultados de esos ensayos confirmaron que los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se unen a hVEGF, pero de manera no detectable a los otros factores de crecimiento proteicos.

25 B.Mapeo de Epítomos

- 30 Se usó un ELISA de unión competitiva para determinar si los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se unen al mismo o a diferentes epítomos (sitios) en hVEGF. Kim, et al., Infect. Immun. 57:944 (1989). Los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF no marcados individuales (A4.6.1 y B2.6.2) o anticuerpo anti-HGF irrelevante (isotipo IgG1) se añadieron a los pocillos de placas de microtitulación que se habían recubierto previamente con hVEGF. Después se añadieron anticuerpos monoclonales anti-hVEGF biotinilados (BIO-A4.6.1 o BIO-B2.6.2). La proporción de anticuerpo biotinilado a anticuerpo no marcado fue 1:1000. La unión de los anticuerpos biotinilados se visualizó por la adición de peroxidasa conjugada con avidina, seguida de diclorhidrato de o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno. La reacción de color, que indica la cantidad de anticuerpo biotinilado unido, se determinó midiendo la densidad óptica (O.D) a longitud de onda de 495 nm.

- 35 Como se muestra en la Figura 1, en cada caso, la unión del anticuerpo anti-hVEGF biotinilado se inhibió por el correspondiente anticuerpo no marcado, pero no por el otro anticuerpo anti-hVEGF no marcado o el anticuerpo anti-HGF. Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se unen a diferentes epítomos en hVEGF.

C.Determinación de Isotipo

- 45 Los isotipos de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se determinaron por ELISA. Las muestras de medio de cultivo (sobrenadante) en el que se hicieron crecer los hibridomas se añadieron a los pocillos de placas de microtitulación que se habían recubierto previamente con hVEGF. Los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF capturados se incubaron con diferentes anti-inmunoglobulinas de ratón, de cabra, conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de isotipo, y se determinó la unión de los anticuerpos conjugados a los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF por la adición de fosfato de p-nitrofenilo. La reacción de color se midió al 405 nm con un lector de placa ELISA.

- 50 Por ese método, se determinó que el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos por ambos hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 es IgG1.

55 D.Afinidad de Unión

- 60 Las afinidades de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 por hVEGF se determinaron por ensayos de unión competitiva. Se añadió una concentración por debajo de la óptima predeterminada de anticuerpo monoclonal a las muestras que contenían 20.000-40.000 cpm de ¹²⁵I-hVEGF (1-2 ng) y diversas cantidades conocidas de hVEGF no marcado (1-1000 ng). Después de 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de antisuero de cabra anti-Ig de ratón (Pel-Freez, Rogers, Ar USA), y se incubaron las mezclas otra hora a temperatura ambiente. Los complejos de anticuerpo y proteína unida (complejos inmunes) se hicieron precipitar por la adición de 500 µl polietilenglicol al 6% (PEG, peso en moles 8000) a 4°C, seguido por centrifugación

a 2000 x G durante 20 min a 4°C. La cantidad de ¹²⁵I-hVEGF unido al anticuerpo monoclonal anti-hVEGF en cada muestra se determinó contando el material sedimentado en un contador gamma.

5 Se calcularon las constantes de afinidad a partir de los datos por análisis de Scatchard. Se calculó que la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 es $1,2 \times 10^9$ litros/mol. Se calculó que la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma B2.6.2 es $2,5 \times 10^9$ litros/mol.

E. Inhibición de la Actividad Mitogénica de hVEGF

10 Se sembraron células del endotelio capilar de la corteza suprarrenal (ACE) bovinas, Ferrara, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84:5773 (1987), a una densidad de 10^4 células/ml en placas multipocillo de 12 pocillos, y se añadieron 2,5 ng/ml de hVEGF a cada pocillo en presencia o ausencia de diversas concentraciones de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 o B2.6.2, o un anticuerpo monoclonal anti-HGF irrelevante. Después de cultivar 5 días, las células en cada pocillo se contaron en un contador Coulter. Como control, se cultivaron células ACE en ausencia de hVEGF añadido.

15 Como se muestra en la Figura 2, ambos anticuerpos monoclonales anti-hVEGF inhibieron la capacidad del hVEGF añadido de mantener el crecimiento o supervivencia de las células ACE bovinas. El anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma A4.6.1 inhibió completamente la actividad mitogénica de hVEGF (más de aproximadamente el 90% de inhibición), mientras que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma B2.6.2 inhibió sólo parcialmente la actividad mitogénica de hVEGF.

F. Inhibición de la Unión de hVEGF

25 Se sembraron células ACE bovinas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/0,5 ml/pocillo en placas de microtitulación de 24 pocillos en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternera al 10%, glutamina 2 mM, y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico. Después de cultivar durante una noche, las células se lavaron una vez en tampón de unión (volúmenes iguales de DMEM y medio F12 más HEPES 25 mM y albúmina de suero bovino al 1%) a 4°C.

30 Se preincubaron 12.000 cpm de ¹²⁵I-hVEGF (aproximadamente 5×10^4 cpm/ng/ml) durante 30 minutos con 5 µg del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1, B2.6.2, o A2.6.1 (250 µl de volumen total), y después las mezclas se añadieron a las células ACE bovinas en las placas de microtitulación. Después de incubar las células durante 3 horas a 4°C, las células se lavaron 3 veces con tampón de unión a 4°C, se solubilizaron por la adición de 0,5 ml de NaOH 0,2 N, y se contaron en un contador gamma.

35 Como se muestra en la Figura 3 (superior), los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 inhibieron la unión de hVEGF a las células ACE bovinas. En contraste, el anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A2.6.1 no tuvo efecto aparente sobre la unión de hVEGF a las células ACE bovinas. Consecuente con los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación celular descrito anteriormente, el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma A4.6.1 inhibió la unión de hVEGF a un mayor grado que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma B2.6.2.

40 Como se muestra en la Figura 3 (inferior), el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma A4.6.1 inhibió completamente la unión de hVEGF a las células ACE bovinas a una proporción molar 1:250 de hVEGF a anticuerpo.

G. Reactividad cruzada con otras isoformas de VEGF

45 Para determinar si el anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 es reactivo con las formas de 121 y 189 aminoácidos de hVEGF, se ensayó el anticuerpo para su capacidad de inmunoprecipitar esos polipéptidos.

50 Se transfectaron células 293 humanas con vectores que comprenden la secuencia codificante de nucleótidos de los polipéptidos hVEGF de 121 y 189 aminoácidos, como se describe. Leung, et al., Science 246:1306 (1989). Dos días después de la transfección, se transfirieron las células a medio que carecía de cisteína y metionina. Las células se incubaron 30 minutos en ese medio, después se añadieron 100 µCi/ml de cada ³⁵S-metionina y ³⁵S-cisteína al medio, y las células se incubaron otras dos horas. El marcaje se fijó transfiriendo las células a medio libre de suero e incubando tres horas. Se recogieron los medios de cultivo celular, y se lisaron las células incubando durante 30 minutos en tampón de lisis (NaCl 150 mM, NP40 al 1%, desoxicolato al 0,5%, dodecilsulfato sódico al 0,1% (SDS), Tris 50 mM, pH 8,0). Los restos celulares se retiraron de los lisados por centrifugación a 200 x G durante 30 minutos.

55 Se incubaron muestras de 500 µl de medios de cultivo celular y lisados celulares con 2 µl de anticuerpo de hibridoma A4.6.1 (2,4 mg/ml) durante 1 hora a 4°C, y después se incubaron con 5 µl de inmunoglobulina de conejo anti-IgG de ratón durante 1 hora a 4°C. Los complejos inmunes de hVEGF marcado con ³⁵S y anticuerpo monoclonal anti-hVEGF se hicieron precipitar con proteína A Sepharose (Farmacia), después se sometieron a electroforesis en gel

de poliacrilamida al 12%-SDS en condiciones reductoras. El gel se expuso a una película de rayos x para el análisis de las proteínas radiomarcadas inmunoprecipitadas por autorradiografía.

Los resultados de ese análisis indicaron que el anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 tenía reacción cruzada con ambas formas de 121 y 189 aminoácidos de hVEGF.

5

EJEMPLO 3

Preparación de Proteínas de Fusión Receptor de VEGF-IgG

10 A.

Las secuencias de nucleótidos y codificantes de aminoácidos del receptor de hVEGF flt se describen en Shibuya, et al., *Oncogene* 5:519-524 (1990). La secuencia codificante del dominio extracelular completo del receptor de hVEGF flt se fusionó a la secuencia codificante de la cadena pesada de IgG1 humana en un proceso de dos etapas.

15

Se usó mutagénesis dirigida de sitio para introducir un sitio de restricción BstBI en el ADN que codifica flt en un sitio 5' del codón para el aminoácido 759 de flt, y para convertir el único sitio de restricción BstEII en el plásmido pBSSK⁺ FC, Bennett, et al., *J. Biol. Chem.* 266:23060-23067 (1991), a un sitio BstBI. El plásmido modificado se digirió con EcoRI y BstBI y el fragmento grande resultante del ADN plasmídico se ligó junto con un fragmento EcoRI-BstBI del ADN de flt que codifica el dominio extracelular (aminoácidos 1-758) del receptor de hVEGF flt.

20

La construcción resultante se digirió con ClaI y NotI para generar un fragmento de aproximadamente 3,3 kb, que después se inserta en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión de mamífero pHEBO2 (Leung, et al., *Neuron* 8:1045 (1992)) por ligamiento. Se modifican los extremos del fragmento de 3,3 kb, por ejemplo, por la adición de enlazadores, para obtener la inserción del fragmento en el vector en la orientación correcta para la expresión.

25

Se transfectan células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, células CEN4 (Leung, et al. *supra*)) con el plásmido pHEBO2 que contienen el inserto de flt por electroporación. Las células transfectadas se cultivan en medio que contiene suero bovino fetal aproximadamente al 10%, glutamina 2 mM, y antibióticos, y se transfieren a una confluencia de aproximadamente el 75% a medio libre de suero. El medio se condiciona durante 3-4 días antes de la recogida, y la proteína de fusión flt-IgG se purifica del medio condicionado por cromatografía en una matriz de afinidad de proteína A esencialmente como se describe en Bennett, et al., *J. Biol. Chem.* 266:23060-23067 (1991).

30

B.

35

Se construyó un ADNc de flt-IgG humano (mencionado como hflt(1-3)-IgG) como se describe en Davis-Smyth et al., *EMBO J.* 15:4919-4927 (1996). Esta forma de receptor truncado incluía solo los primeros tres dominios tipo inmunoglobulina de flt humano fusionado a un Fc-IgG. Véase Ferrara et al., *Nature Medicine* 4:336 (1998).

40

Se construyó un flt-IgG murino (mencionado como mflt(1-3)-IgG) por amplificación por PCR del ADNc de embrión de 17 días de ratón (Clontech, Palo Alto, CA) usando cebadores descritos en Ferrara et al., *supra*. El diseño del cebador de PCR 3' aseguró que la expresión del mflt(1-3) estuviera en fase con un clon de Fc de IgG2b murino. El fragmento de 1 kb resultante primero se clonó en un vector de clonación TA (Invitrogen, San Diego, CA) como un fragmento ClaI-BstEII. Este fragmento se ligó al extremo 5' de Fc de IgG2b murino en un vector pRK. Este plásmido posibilitó la expresión de la proteína de fusión mflt(1-3)-IgG cuando se transfirió a células de mamífero.

45

Para la expresión en células CHO, los ADNc se subclonaron en un vector dicistrónico que une la expresión del marcador dihidrofolato reductasa a la expresión de la proteína de fusión obtenida de flt. Véase, Lucas et al., *Nucleic Acid Res.* 24:1774-1779 (1996). Los plásmidos se introdujeron en células DP12, un derivado de la línea celular CHO-K1DUXB11 desarrollada por L. Chasin (Columbia University, Nueva York) mediante lipofección y se seleccionaron para el crecimiento en medio libre de glicina-hipoxantina-timidina (G-H-T). Chisholm et al., *DAN Cloning 4: A Practical Approach, Mammalian Systems* (eds. Glover & Hames) páginas 1-39 (Oxford Press, 1995). Los clones de la primera ronda de selección se sembraron posteriormente en placas a concentraciones en aumento de metotrexato. Después los clones se exploraron para la producción por ELISA para el Fc humano y murino. Los clones que presentaron la producción más alta se adaptaron a cultivo en suspensión, y se recogieron los cultivos libres de suero y se purificaron por proteína A-Sepharose. Se determinaron las concentraciones de proteína por análisis de aminoácidos. El contenido de endotoxina del material purificado final no excedió de 0,5 eu/mg.

55

Como se describe en Ferrara et al., *supra*, tanto la proteína de fusión flt(1-3)-IgG murina como la proteína de fusión flt(1-3)-IgG humana fueron activas en la inhibición de la bioactividad de VEGF en el modelo de roedor ensayado.

60

EJEMPLO 4

Inhibición del Crecimiento Tumoral con Antagonistas de hVEGF

65

Se ensayaron diversas líneas de células tumorales que crecían en cultivo para la producción de hVEGF por ELISA. Se descubrió que las líneas de células tumorales de ovario, pulmón, colon, gástricas, de mama, y de cerebro

5 producían hVEGF. Tres líneas celulares que producían hVEGF, NEG 55 (también mencionada como G55) (línea de células de glioma humano obtenida de Dr. M. Westphal, Department of Neurosurgery, University Hospital Eppendor, Hamburg, Alemania, también mencionada como G55), A-673 (línea de células de rhabdomyosarcoma humano obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), como línea celular número CRL 1598), y SK-LMS-1 (línea celular de leiomyosarcoma obtenida de la ATCC como línea celular número HTB 88), se usaron para estudios adicionales.

10 Se inyectaron por vía subcutánea ratones Beige/nude hembras de seis a diez semanas de edad (Charles River Laboratory, Wilmington, Massachussets USA) con $1-5 \times 10^6$ células tumorales en 100-200 μ l de PBS. En diversos momentos después de que se estableciera el crecimiento tumoral, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal una o dos veces por semana con diversas dosis de anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1, un anticuerpo monoclonal anti-gp120 irrelevante (5B6), o PBS. El tamaño tumoral se midió cada semana, y al final del estudio, los tumores se extirparon y se pesaron.

15 Se muestra el efecto de diversas cantidades de anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre el crecimiento de tumores NEG 55 en ratones en las Figuras 4 y 5. La Figura 4 muestra que los ratones tratados con 25 μ g o 100 μ g de anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 comenzando una semana después de la inoculación de células NEG 55 tuvieron una velocidad sustancialmente reducida de crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con anticuerpo irrelevante o PBS. La Figura 5 muestra que cinco semanas después de la inoculación de las células NEG 55, el tamaño de los tumores en ratones tratados con anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 fue aproximadamente del 50% (en el caso de ratones tratados con dosificaciones de 25 μ g del anticuerpo) al 85% (en el caso de ratones tratados con dosificaciones de 100 μ g del anticuerpo) menor que el tamaño de los tumores en ratones tratados con anticuerpo irrelevante o PBS.

25 El efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre el crecimiento de tumores SK-LMS-1 en ratones se muestra en la Figura 6. Cinco semanas después de la inoculación de las células SK-LMS-1, el tamaño medio de los tumores en ratones tratados con el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 fue aproximadamente un 75% menor que el tamaño de tumores en ratones tratados con anticuerpo irrelevante o PBS.

30 El efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 sobre el crecimiento de tumores A673 en ratones se muestra en la Figura 7. Cuatro semanas después de la inoculación de las células A673, el tamaño medio de los tumores en ratones tratados con anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 fue aproximadamente del 60% (en el caso de ratones tratados con dosificaciones de 10 μ g del anticuerpo) a más del 90% (en el caso de ratones tratados con dosificaciones de 50-400 μ g del anticuerpo) menor que el tamaño de los tumores en ratones tratados con anticuerpo irrelevante o PBS.

EJEMPLO 5

Análisis del Efecto Directo de Anticuerpo Anti-hVEGF en Células Tumorales que Crecen en Cultivo

40 Se sembraron células de glioblastoma humano NEG55 o células de rhabdomyosarcoma A673 a una densidad de 7×10^3 células/pocillo en placas multipocillo (12 pocillos/placa) en medio F12/DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%, glutamina 2 mM, y antibióticos. Después se añadió anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 a los cultivos celulares a una concentración final de 0-20,0 μ g anticuerpo/ml. Después de cinco días, las células que crecían en los pocillos se disociaron por exposición a tripsina y se contaron en un contador Coulter.

50 Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados de esos estudios. Como es evidente, el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 no tuvo ningún efecto significativo sobre el crecimiento de las células NEG55 o A673 en cultivo. Estos resultados indican que el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 es no citotóxico, y sugiere fuertemente que los efectos antitumorales observados del anticuerpo se deben a su inhibición de neovascularización mediada por VEGF.

EJEMPLO 6

Efecto de Anticuerpo Anti-hVEGF sobre la Quimiotaxis de Células Endoteliales

55 La quimiotaxis de células endoteliales y otras células, incluyendo monocitos y linfocitos, juega un papel importante en la patogénesis de artritis reumatoide. La migración de células endoteliales y la proliferación acompañan a la angiogénesis que sucede en el sinovio reumatoide. El tejido vascularizado (pannus) invade y destruye el cartílago articular.

60 Para determinar si los antagonistas de hVEGF impiden este proceso, se ensayó el efecto del anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 en la quimiotaxis de células endoteliales estimulada por el fluido sinovial de pacientes que tienen artritis reumatoide. Como control, también se ensayó el efecto del anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 en la quimiotaxis de

células endoteliales estimulada por fluido sinovial de pacientes que tienen osteoartritis (la angiogénesis que sucede en artritis reumatoide no sucede en osteoartritis).

Se ensayó la quimiotaxis de células endoteliales usando cámaras de Boyden modificadas de acuerdo con procedimientos establecidos. Thompson, et al., *Cancer Res.* 51:2670 (1991); Phillips, et al., *Proc. Exp. Biol. Med.* 197:458 (1991). Se dejó que aproximadamente 10^4 células endoteliales de la vena umbilical humana se adhirieran a filtros recubiertos con gelatina (tamaño de poro de 0,8 micrómetros) en microcámaras multipocillo de 48 pocillos en medio de cultivo que contenía suero bovino fetal al 0,1%. Después de aproximadamente dos horas, las cámaras se invirtieron y se añadieron las muestras de ensayo (fluido sinovial de artritis reumatoide, fluido sinovial de osteoartritis, FGF básico (bFGF) (a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$), o PBS) y anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 (a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$) a los pocillos. Después de dos a cuatro horas, las células que habían migrado se tiñeron y contaron.

La Figura 10 muestra resultados promedio de esos estudios. Los valores mostrados en la columna marcada "Fluido Sin." y mostrados en la parte inferior de la página para los controles son la cantidad media de células endoteliales que migraron en presencia de fluido sinovial, bFGF, o PBS solo. Los valores en la columna marcada "Fluido Sin. + mAB VEGF" son la cantidad media de células endoteliales que migraron en presencia de fluido sinovial más anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 añadido. Los valores en la columna marcada "% de Supresión" indican el porcentaje de reducción en la migración de células endoteliales inducida por fluido sinovial como resultado de la adición de anticuerpo anti-hVEGF. Como se ha indicado, en anticuerpo anti-hVEGF inhibió significativamente la capacidad del fluido sinovial de artritis reumatoide (porcentaje medio de inhibición del 53,40), pero no del fluido sinovial de osteoartritis (porcentaje medio de inhibición del 13,64), de inducir la migración de células endoteliales.

EJEMPLO 7

25 Efecto de Antagonista de VEGF en Edema Cerebral

Se realizó un ensayo in vivo para determinar los efectos de un antagonista fit-IgG en edema cerebral. La pérdida de integridad de BBB y la formación de edema cerebral a menudo sucede en la patogénesis de infarto cerebral. Se cree que el fallo de la BBB en apoplejía isquémica sucede predominantemente después de las primeras 24 horas de la aparición de apoplejía. Además, se cree que los efectos beneficiosos de una rápida y adecuada restauración del flujo sanguíneo después de un suceso de isquemia agudo pueden minarse por lesión por reperfusión de la microvasculatura cerebral que comprende la BBB, contribuyendo a la formación de edema cerebral. Klatzo et al. Eds., *Brain Edema*, Tokio, Springer (1984), páginas 1-5. El ensayo in vivo descrito a continuación se diseñó para reflejar estos aspectos de la afección clínica.

Se indujo isquemia cortical focal en cerebro de ratón por la oclusión de la arteria cerebral media (MCA) usando técnicas descritas previamente por Chen et al., *Stroke* 17:738-743 (1986). Se anestesiaron los ratones (C57BL-6J; 18-25 gramos) con isoflurano al 1,5% en oxígeno. Se expuso la MCA derecha mediante craneotomía y se ligó con una sutura 11-0. La arteria carótida común ipsilateral también se ocluyó durante el periodo isquémico. Los vasos permanecieron ocluidos durante 45 minutos. Antes de la cirugía, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se administró por vía intraperitoneal fit-IgG murino (como se describe en el Ejemplo 3B anterior; también descrito en Ferrara et al., *Nature Medicine* 4:336 (1998)) o un anticuerpo anti-GP120 murino de control irrelevante que pertenece al mismo isotipo que el Fc en fit-IgG [Ferrara et al., supra] a una dosis de 10 mg/kg a 12 horas antes de la cirugía, en el momento de la reperfusión y otra vez a 1 ó 2 días después de la cirugía. El grado de formación de edema se evaluó por formación de imágenes de MR ponderadas T2 24 horas después de la aparición de isquemia. El tamaño final del infarto se evaluó 8-12 semanas después usando MRI anatómica de alta resolución. Se tomó un subconjunto de animales (n=12) para la verificación del tamaño del infarto usando técnicas de histología convencionales.

Como se muestra en la Fig. 11, la administración de fit-Ig provocó una reducción significativa en el volumen del edema cerebral como se define por la región de hiperintensidad en la exploración de MRI ponderada T2 conseguida 1 día después de la aparición de isquemia (reducción del 27%, ensayo t de Student $p=0,01$, $n=15$ y 16 en los grupos de control y tratamiento, respectivamente). Las imágenes de MR ponderadas T2 representativas que muestran la aparición de edema cortical como una región de alta señal de intensidad en comparación con el lado contralateral se muestran en la Fig. 12. En este modelo, la progresión del daño isquémico conduce a la pérdida de tejido cortical y cavitación. El volumen del infarto final puede, por lo tanto, estimarse a partir de las imágenes anatómicas de alta resolución definiendo la cantidad de corteza no afectada y comparándola con el hemisferio contralateral. Como se muestra en la Fig. 13, el tamaño del infarto cortical se reduce significativamente por la administración de fit-IgG medido 8-12 semanas después (reducción del 26% en el tamaño del infarto, ensayo t de Student $p=0,009$, $n=11$ y 14 en los grupos de control y tratamiento, respectivamente). Hubo una buena correlación entre el volumen del infarto medido por MRI y el determinado usando histología convencional ($R^2=0,633$). Por consiguiente, los animales tratados mostraron una reducción en el desarrollo de edema cerebral, que puede proporcionar adicionalmente neuroprotección potenciada. Estos resultados indican que la inhibición de la actividad biológica de VEGF puede reducir la reperfusión isquémica relacionada con edema y lesión cerebral.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un antagonista de hVEGF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que padece edema asociado con ictus isquémico, o para la prevención de un edema en un mamífero donde el edema está asociado con ictus isquémico,
donde el antagonista de hVEGF interfiere con la unión de hVEGF a un receptor celular,
y donde el antagonista de hVEGF comprende (i) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a hVEGF o a un receptor de hVEGF, (ii) un fragmento o una variante de secuencia de aminoácidos de hVEGF que se une a un receptor de hVEGF pero que no presenta actividad biológica de hVEGF nativo o (iii) un receptor de hVEGF u una variante del mismo que puede unirse a hVEGF.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la apoplejía isquémica es apoplejía trombótica, apoplejía embólica, apoplejía hemodinámica, o apoplejía lacunar.
- 15 3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el medicamento es para tratar al mamífero inmediatamente después de la detección o diagnóstico de la apoplejía.
- 20 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el medicamento es para tratar al mamífero en 1 a 4 días de la aparición de la apoplejía.
5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el mamífero es un ser humano.
- 25 6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el antagonista de hVEGF comprende un anticuerpo anti-hVEGF.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el anticuerpo anti-hVEGF comprende un anticuerpo quimérico.
- 30 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, donde el anticuerpo anti-hVEGF comprende un anticuerpo humanizado.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde dicho anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal.
- 35 10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el antagonista de hVEGF comprende una proteína de fusión del receptor de hVEGF.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde la proteína de fusión del receptor de hVEGF comprende una secuencia del dominio extracelular de un receptor de hVEGF fusionada a una inmunoglobulina.
- 40 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10 ó 11, donde la proteína de fusión del receptor de hVEGF comprende una proteína de fusión flt-IgG.

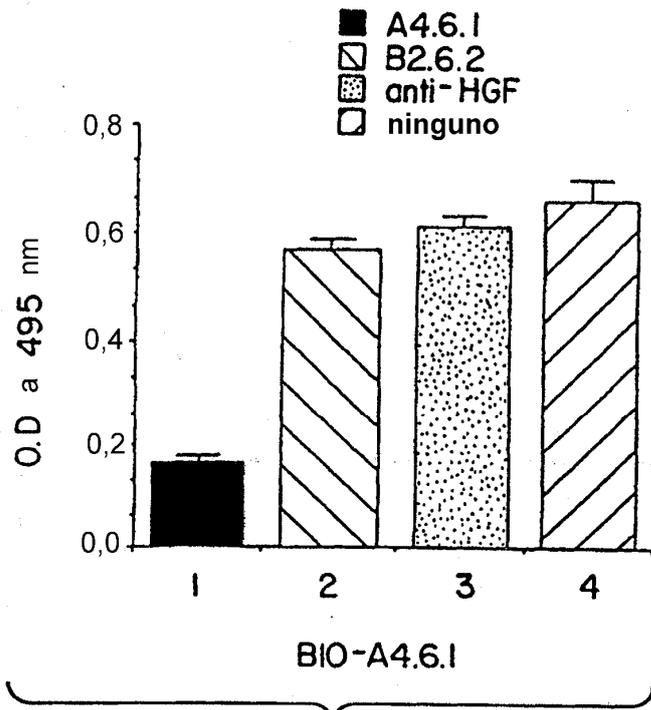


FIG. 1a

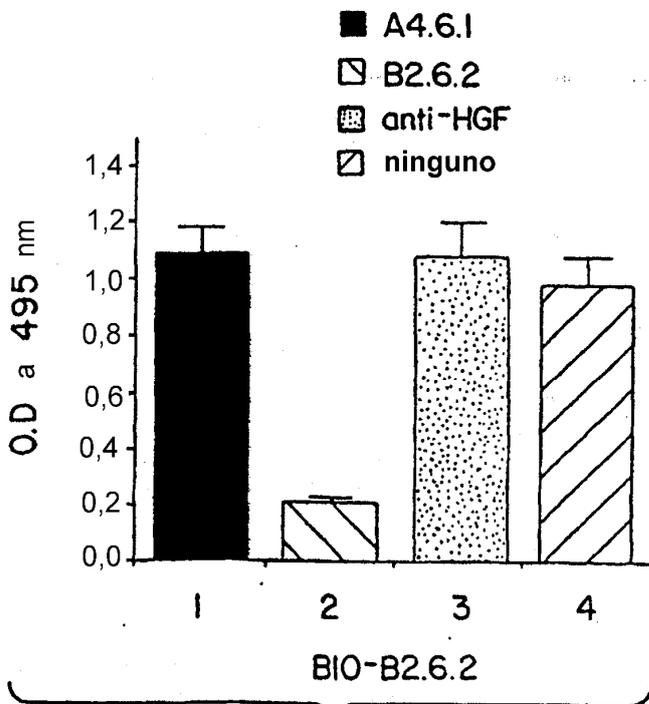


FIG. 1b

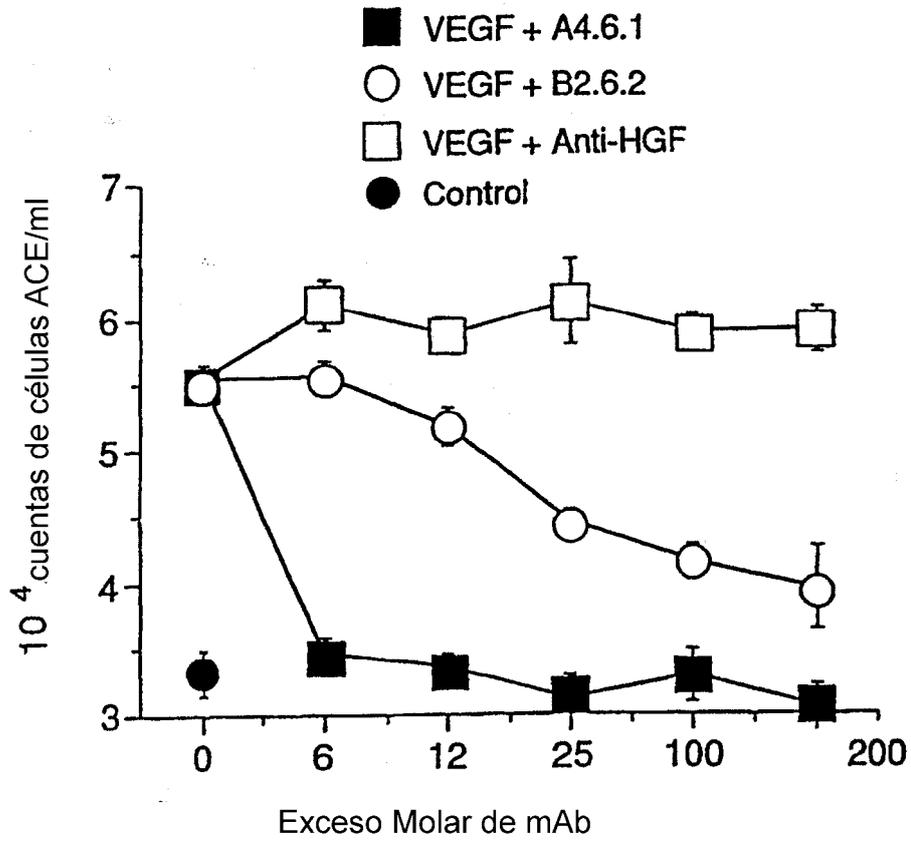


FIG. 2

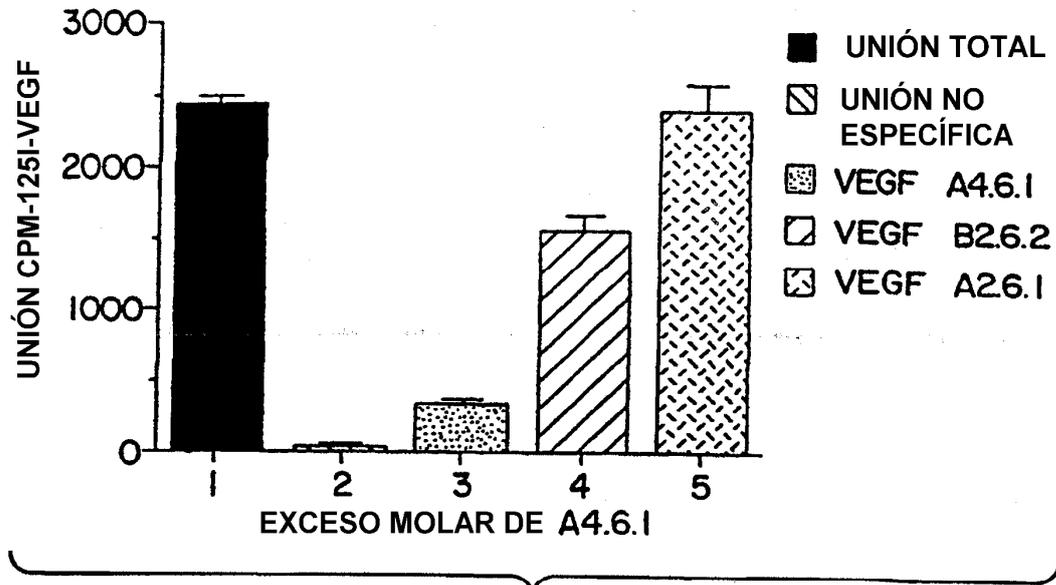


FIG._3a

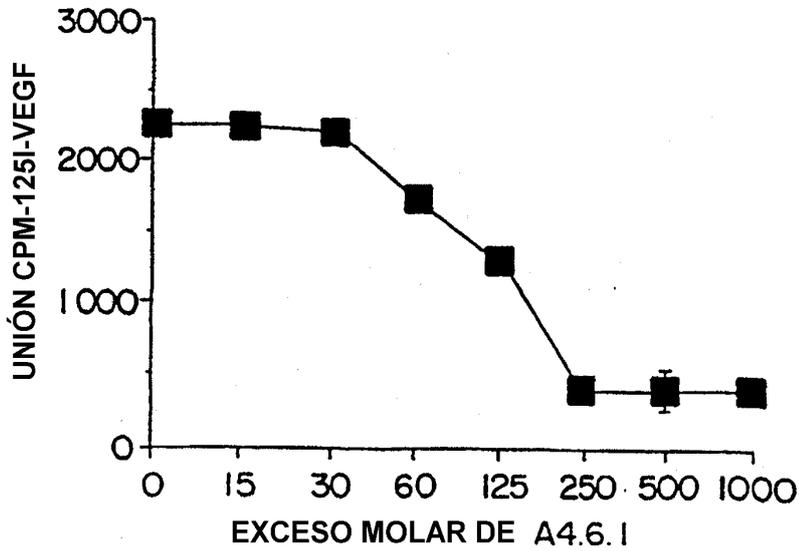


FIG._3b

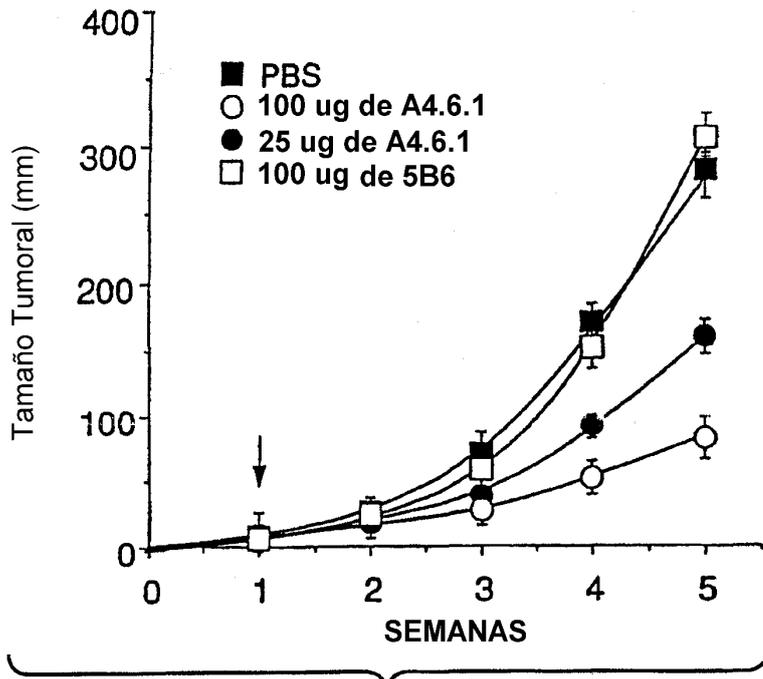


FIG. 4

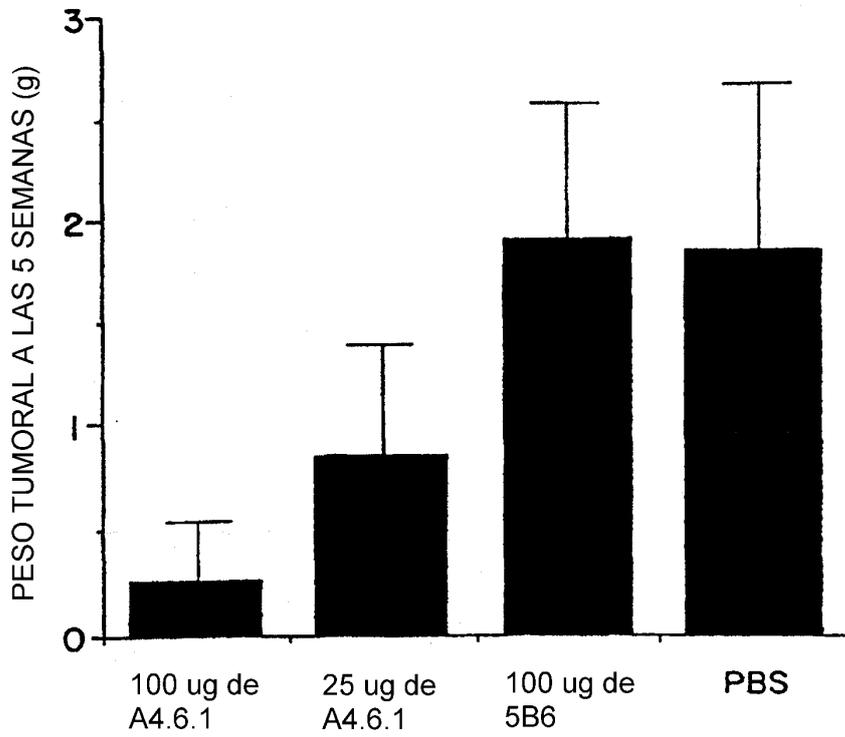


FIG. 5

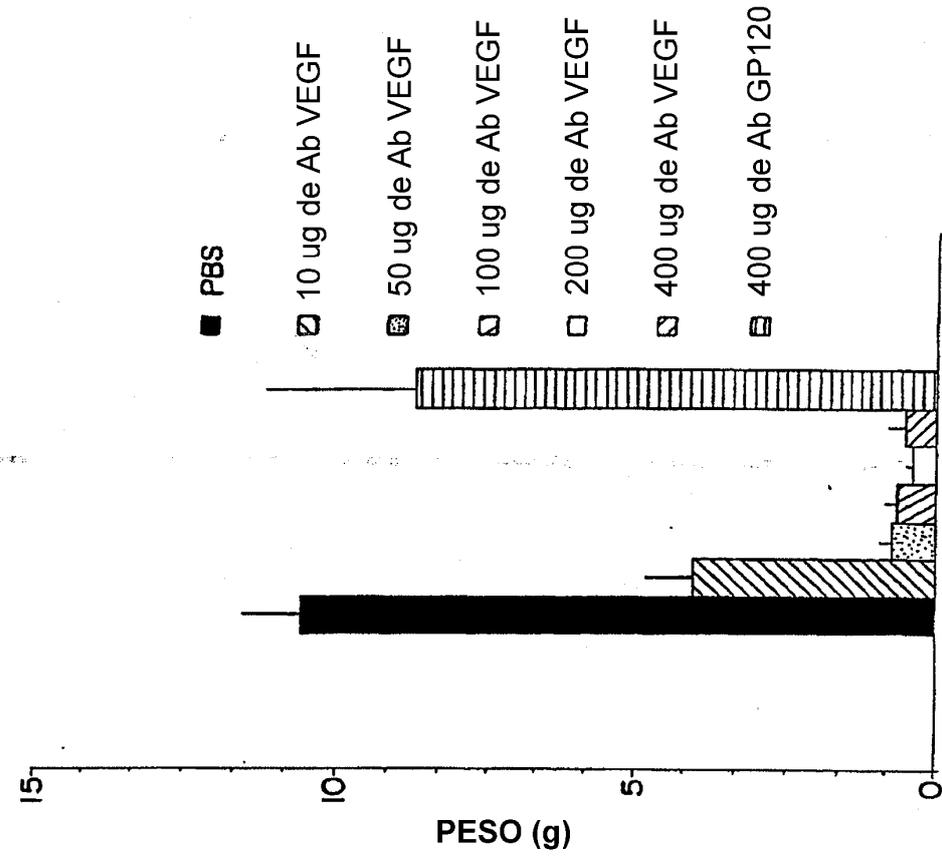


FIG.-7

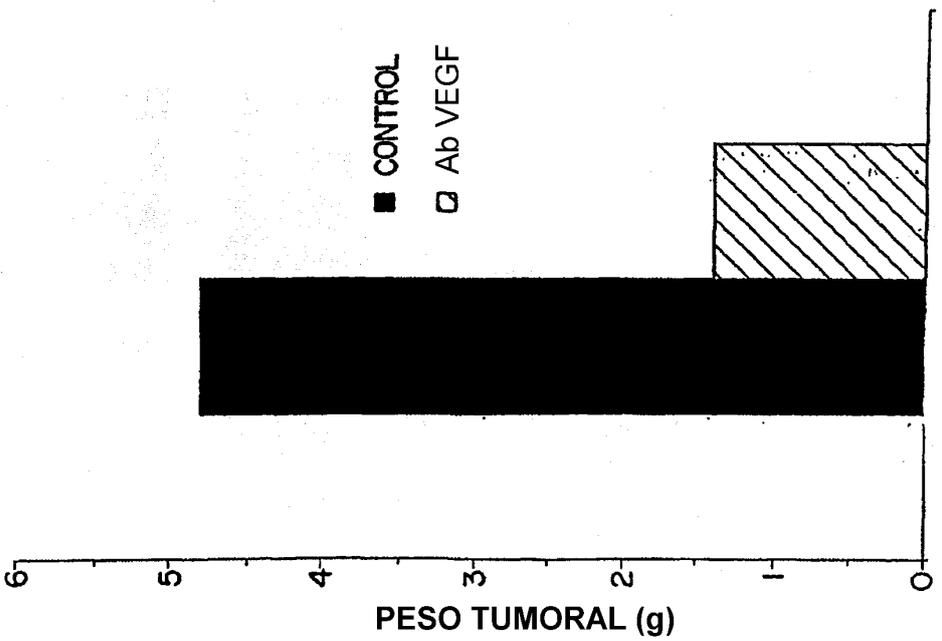


FIG.-6

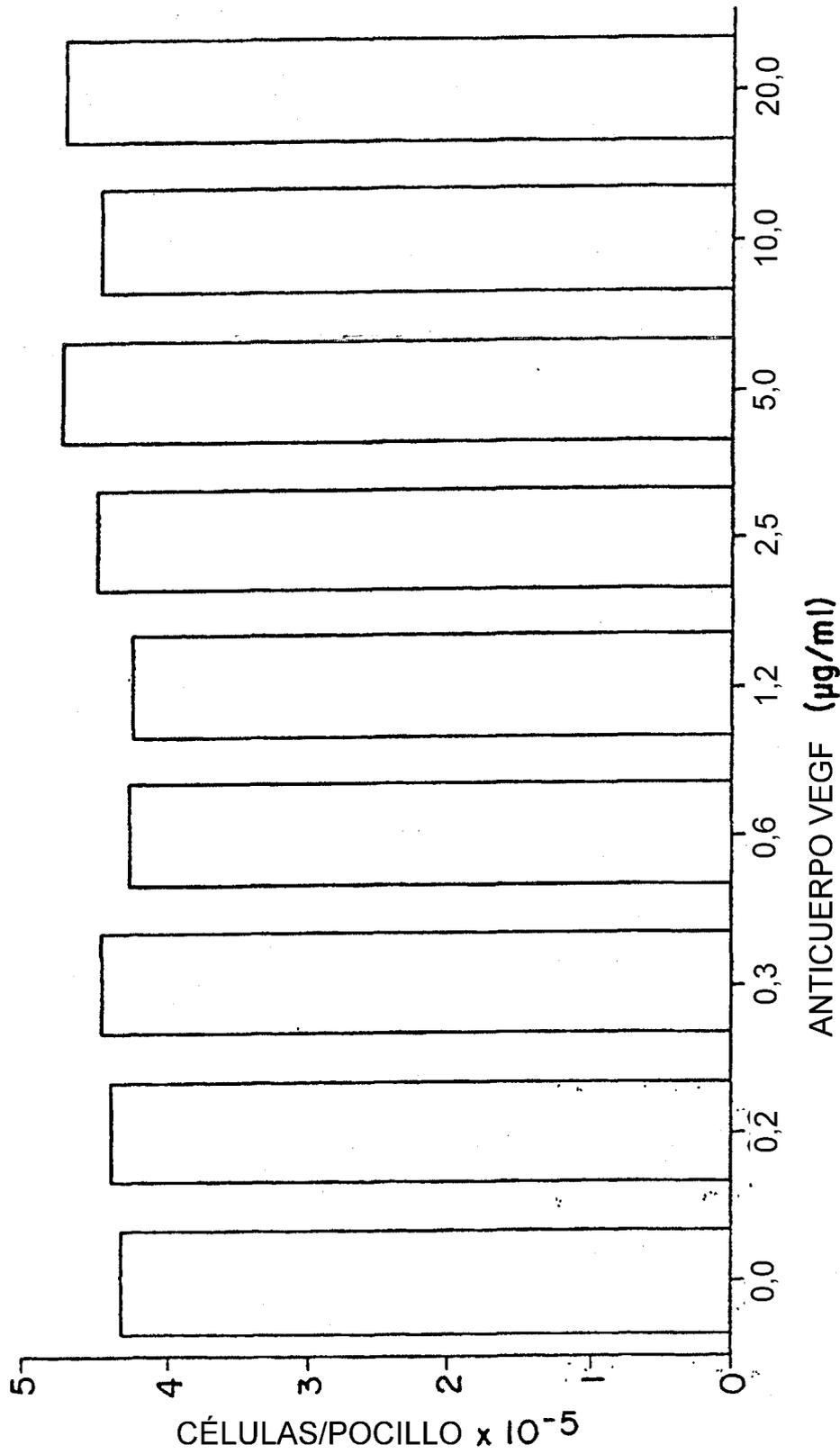


FIG.-8

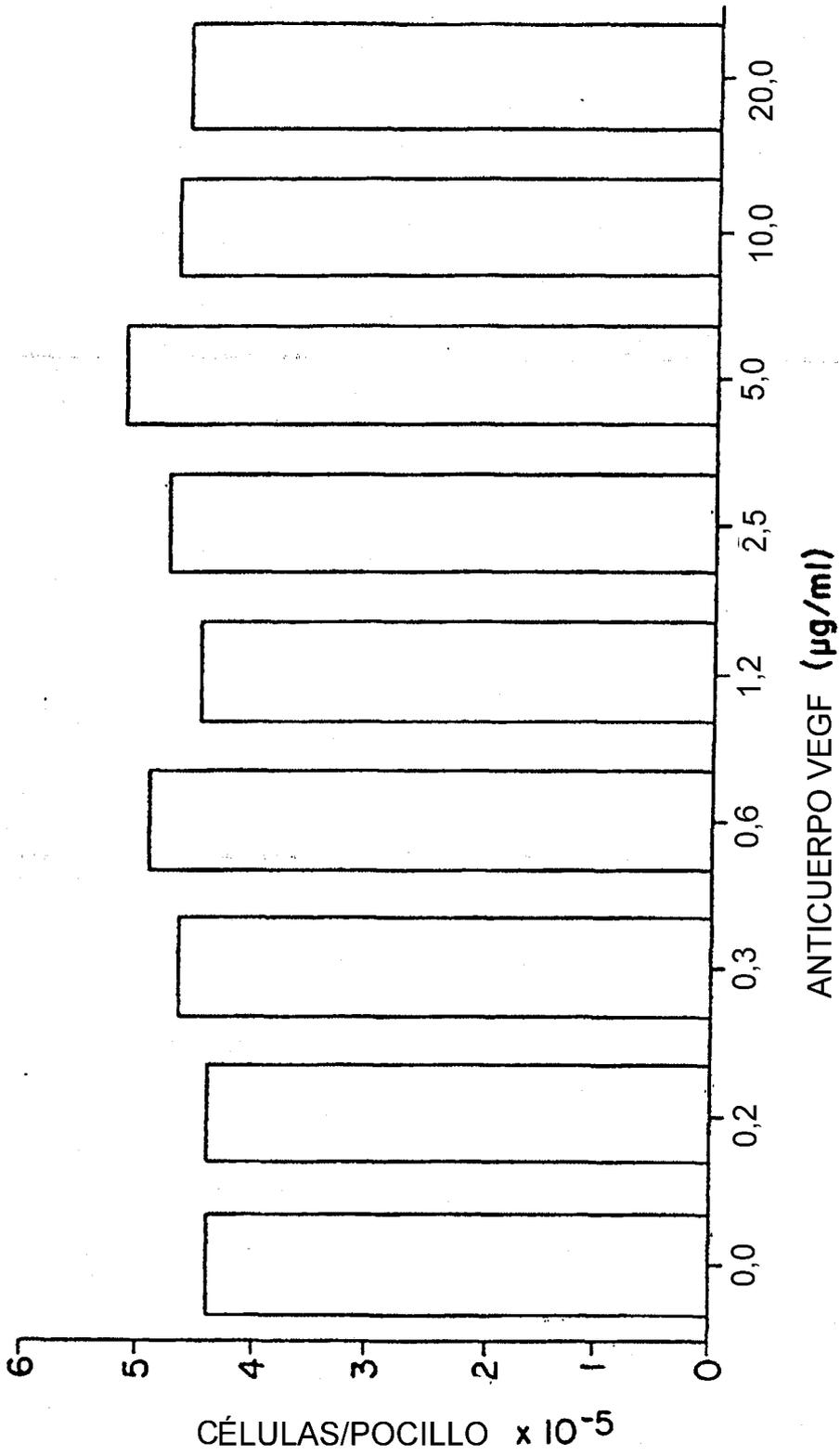


FIG.-9

Tipo de muestra	Nº de muestra	Fecha de ensayo	Fluido Sin.	Fluido Sin. + mAB VEGF	% de Supresión
Fluido Sin. Reumatoide	318	7.5.92	5,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	48
	150	7.5.92	7,0 ± 0,3	2,8 ± 0,4	60
	312	7.5.92	6,7 ± 0,4	3,7 ± 0,3	45
	264	7.5.92	6,2 ± 0,4	3,1 ± 0,3	50
	267	7.5.92	5,7 ± 0,6	4,4 ± 0,3	23
	202	22.5.92	10,0 ± 0,5	3,4 ± 0,6	66
	314	22.5.92	7,5 ± 0,3	3,1 ± 0,6	59
	237	22.5.92	6,1 ± 0,5	2,2 ± 0,3	64
	206	22.5.92	6,7 ± 0,5	2,2 ± 0,3	67
	317	22.5.92	5,2 ± 0,3	2,5 ± 0,6	52
Fluido Sin. Osteoartritis	165	2.6.92	4,0 ± 0,3	2,8 ± 0,4	30
	211	2.6.92	3,4 ± 0,5	3,0 ± 0,2	11,7
	195	2.6.92	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,3	5,7
	122	2.6.92	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,4	13,5
	16	2.6.92	4,1 ± 0,3	3,8 ± 0,5	7,3

% Medio de Supresión para Fluidos RA 53,4 4,2
 % Medio de Supresión para Fluidos OA 13,6 3,9
 Los fluidos sinoviales se diluyeron 1:50

Controles:

2.6.92	PBS	3,3 0,30
	1 µg/ml de bFGF	3,7 0,38
22.5.92	PBS	1,2 0,38
	1 µg/ml de bFGF	7,8 0,31
2.5.92	PBS	1,3 0,18
	1 µg/ml de bFGF	9,0 0,41

FIG. 10

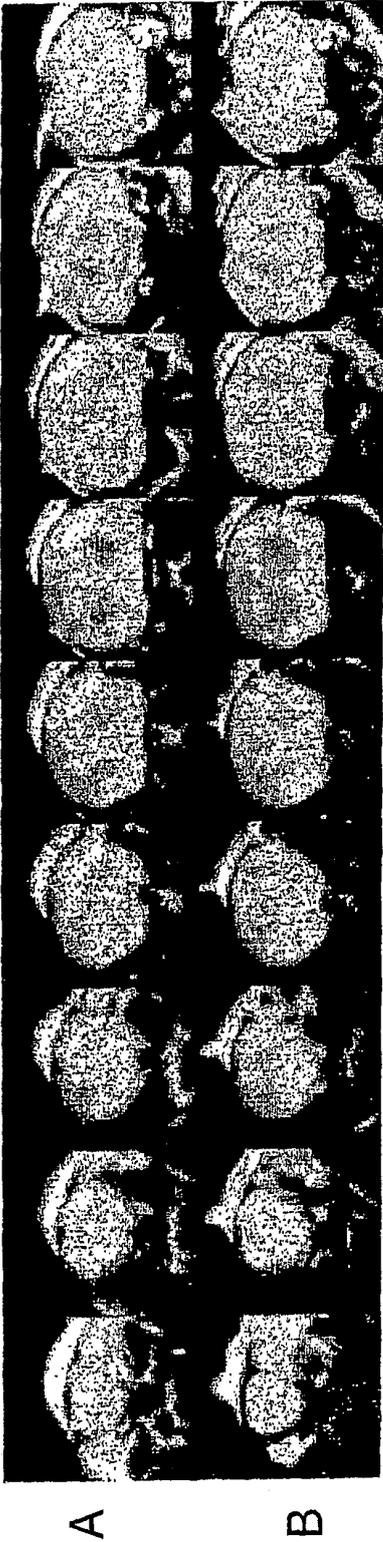


FIG. 12

	10	20	30	40
F(ab)-12	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
Y0243-1	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0238-3	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0313-1	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0317	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
			CDR-L1	
	50	60	70	80
F(ab)-12	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FLLTISSLQP
Y0243-1	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FLLTISSLQP
Y0238-3	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FLLTISSLQP
Y0313-1	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FLLTISSLQP
Y0317	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FLLTISSLQP
			CDR-L2	
	90	100	110	
F(ab)-12	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0243-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0238-3	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0313-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0317	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
			CDR-L3	

FIG. 14A

	10	20	30	40
F(ab)-12	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWRQA
Y0243-1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNWRQA
Y0238-3	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWRQA
Y0313-1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNWRQA
Y0317	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNWRQA
			CDR-H1	
	50	60	70	80
F(ab)-12	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0243-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0238-3	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0313-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0317	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
			CDR-H2	CDR-7
	90	100	110	
F(ab)-12	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWFY	DVWGQGTL
Y0243-1	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWFY	DVWGQGTL
Y0238-3	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	YYYGISHWFY	DVWGQGTL
Y0313-1	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	YYYGISHWFY	DVWGQGTL
Y0317	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	YYYGISHWFY	DVWGQGTL
			CDR-H3	

FIG. 14B

□ = diferencias a partir de F(ab)-12

		10	20	30	
F (ab) -12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ				
Y0192	DIQ□□TQSPSSLSASVGDRVTITC□RANEQLSNYLNWYQQ				
Y0238-3	DIQ□□TQSPSSLSASVGDRVTITC□RANEQLSNYLNWYQQ				
Y0239-19	DIQ□□TQSPSSLSASVGDRVTITC□RANEQLSNYLNWYQQ				
Y0313-2	DIQ□□TQSPSSLSASVGDRVTITC□RANEQLSNYLNWYQQ				
					CDR-L1
		40	50	60	70
F (ab) -12	KPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS				
Y0192	KPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS				
Y0238-3	KPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS				
Y0239-19	KPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS				
Y0313-2	KPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS				
					CDR-L2
		80	90	100	
F (ab) -12	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV				
Y0192	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV				
Y0238-3	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV				
Y0239-19	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV				
Y0313-2	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV				
					CDR-L3

FIG. 15A

□ = diferencias a partir de F(ab)-12

		10	20	30		
F(ab)-12	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAASGYTF	TNYGMNWVR		
Y0192	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAASGYTF	TNYGMNWVR		
Y0238-3	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAASGYD	FTNYGMNWVR		
Y0239-19	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAASGYTF	TNYGMNWVR		
Y0313-2	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAASGYD	FTNYGMNWVR		
					CDR-H1	
F(ab)-12	40	QAPGKGLEWVGWINTY	50	TGEP	60	70
Y0192		YAAADFKRRFT		FLD		TSKSTA
Y0238-3		YAAADFKRRFT		FLD		TSKSTA
Y0239-19		YAAADFKRRFT		FLD		TSKSTA
Y0313-2		YAAADFKRRFT		FLD		TSKSTA
						CDR-H2
F(ab)-12	80	YMQMNSLRAEDTAVY	90	CAKYPHYG	100	
Y0192		YCAKYPHYG		---		SSHWF
Y0238-3		YCAKYPHYG		---		SSHWF
Y0239-19		YCAKYPHYG		---		SSHWF
Y0313-2		YCAKYPHYG		---		SSHWF
						CDR-H3

FIG. 15B

ES 2 245 833 T5

LISTA DE SECUENCIAS

<110>Genentech, Inc.
 <120>Antagonistas del Factor de Crecimiento Celular del Endotelio Vascular y usos de los mismos
 5 <130>P1717-PCT
 <140>PCT/US99/29475
 <141>09-12-1999
 <150>US 09/218.481
 <151>22-12-1998
 10 <160>16
 <210>1
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 15 <400>1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

 Ile Lys Arg Thr Val
 110
 <210>2
 <211>110
 <212>PRT
 20 <213>Homo sapiens
 <400>2
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

 Ile Lys Arg Thr Val
 110

ES 2 245 833 T5

5 <210>3
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>3
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val
 110

10 <210>4
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>4
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val
 110

15 <210>5
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>5

ES 2 245 833 T5

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1                               10                      15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20                               25                      30
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35                               40                      45
Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50                               55                      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65                               70                      75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80                               85                      90
Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95                               100                     105
Ile Lys Arg Thr Val
 110

```

ES 2 245 833 T5

5 <210>6
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>6
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 95 100 105 110

10 <210>7
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>7
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val
 110

15 <210>8
 <211>110
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>8

ES 2 245 833 T5

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val
 110

ES 2 245 833 T5

5 <210>9
 <211>118
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 110 115

10 <210>10
 <211>118
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30
 His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 110 115

15 <210>11
 <211>118
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

ES 2 245 833 T5

1		5		10		15									
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
		20							25						30
Asn	Tyr	Gly	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40						45
Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	
				50					55						60
Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	
				65					70						75
Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85						90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	
				95					100						105
Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
				110					115						

ES 2 245 833 T5

5 <210>12
 <211>118
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>12__
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30
 His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 110 115

10 <210>13
 <211>118
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30
 His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 110 115

15 <210>14
 <211>118
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>14

ES 2 245 833 T5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 110 115

<210>15
 <211>121
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>15

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn
 95 100 105
 Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 110 115 120

Leu
 <210>16
 <211>121
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>16

10

ES 2 245 833 T5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30
 His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn
 95 100 105
 Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 110 115 120
 Leu