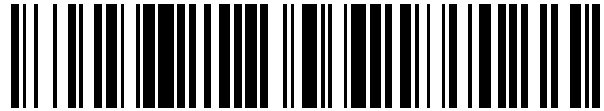


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 976**

21 Número de solicitud: 201031402

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

21.09.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.04.2012

Fecha de la concesión:

22.04.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.05.2013

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS (CNIO)
MELCHOR FERNÁNDEZ ALMAGRO 3
28029 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ TORRECUADRADA, Jorge Luis y
ABENGOZAR INFANTES, María Ángeles**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **ANTICUERPO CONTRA EPHRIN B2 Y SU USO.**

57 Resumen:

Anticuerpo contra ephrin B2 y su uso.

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo contra ephrin B2 y a su uso para detectar dicha proteína y como medicamento para inhibir la angiogénesis y la linfangiogénesis, en el tratamiento de enfermedades en las que estos procesos están implicados como, por ejemplo, el cáncer.

ES 2 378 976 B1

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra ephrin B2 y su uso

La presente invención pertenece al campo de la Biotecnología y la Biomedicina, y se refiere a un nuevo anticuerpo específico contra ephrin B2, capaz de bloquear la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y linfáticos (linfoangiogénesis). Además, la presente invención se refiere al uso de dicho anticuerpo, por ejemplo, para la preparación de un medicamento.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

La angiogénesis o formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de preexistentes desempeña un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario y en la vida postnatal: reproducción, cicatrización e inflamación. Aunque los mecanismos moleculares responsables de la transición de una célula endotelial hacia un fenotipo angiogénico no son completamente conocidos, se trata de un proceso complejo que implica la proliferación, migración y ensamblaje de células endoteliales, seguido por el reclutamiento de otras células perivasculares como pericitos o células musculares y de la remodelación de la matriz extracelular (Risau, W. Nature 1997; 386:671-674). El crecimiento incontrolado de los vasos sanguíneos es un trastorno subyacente en numerosas patologías como artritis reumatoide o retinopatía diabética y, sobre todo en procesos neoplásicos. El crecimiento tumoral va a depender del constante aporte de oxígeno y nutrientes a través de la constitución de una red de nuevos vasos sanguíneos, de tal manera que en ausencia de la vascularización adecuada, las células sufren un proceso de necrosis y/o apoptosis que inhibe o modera el incremento del volumen tumoral.

Además de vasos sanguíneos, el sistema circulatorio de los vertebrados está constituido por vasos linfáticos que también juegan un papel crítico durante el desarrollo del organismo y en procesos patológicos. El sistema linfático drena el líquido intersticial de los tejidos y lo reincorpora al sistema sanguíneo;

además, absorbe lípidos del sistema digestivo, forma parte de la defensa inmune del individuo transportando células del sistema inmune, por ejemplo en inflamación, y en condiciones patológicas induce diferentes tipos de linfedema, enfermedades inflamatorias y participa en la invasión y metástasis de carcinomas (Tammela, T. y Alitalo, K. Cell 2010; 140:460-76). El estudio de la linfangiogénesis o formación de vasos linfáticos a partir de preexistentes permaneció postergado durante muchas décadas y no es hasta los últimos años cuando se han descrito mecanismos biomoleculares y marcadores específicos, los cuales se están utilizando actualmente para estudiar el proceso de diseminación tumoral y metástasis.

Durante el desarrollo embrionario, los vasos sanguíneos se originan a partir de precursores endoteliales derivados del mesodermo en un proceso llamado vasculogénesis, mientras que la formación de los vasos linfáticos parece iniciarse a partir de un conjunto de células endoteliales venosas en la región yugular y perimesonéfrica. Dado que su origen embrionario es común, ambos sistemas vasculares comparten mecanismos moleculares similares que regulan su desarrollo y maduración. Se han identificado varias vías de señalización en las que receptores tirosin quinasa juegan un papel muy importante en estos mecanismos de formación del sistema cardiovascular, en concreto, la vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a través de sus correspondientes receptores (VEGFR) en cooperación con la actividad de receptores de Tie-1 y Tie-2 regulados por angiopoyetinas (Thurston, G. Cell Tissue Res. 2003; 314:61-68). Además, se ha demostrado que otro grupo de moléculas, las ephrins (acrónimo del inglés “*erythropoietin producing hepatoma receptor interactors*”), junto con sus correspondientes receptores (Eph), también está implicado en el remodelado del sistema vascular sanguíneo (Adams, RH y Klein, R. Trends Cardiovasc Med. 2000; 10: 183-188) y linfático (Mäkinen, T *et al.* Genes Dev. 2005; 19:397-410). Esta familia comprende el mayor grupo de tirosin quinasa conocido, con 14 receptores y 8 ligandos, y se subdivide en dos categorías de receptores, Eph A y Eph B, en base a la homología de su secuencia y a las propiedades de unión a los

correspondientes ligandos. Los receptores EphA se unen a los ligandos del subgrupo ephrin A, caracterizados por estar anclados a la membrana a través de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que los receptores Eph B se unen a ligandos del subgrupo ephrin B, que se encuentran anclados a la membrana a través de una región transmembrana seguida por un dominio citoplásmico. Se ha descrito que las arterias expresan el ligando transmembrana ephrin B2 y las venas expresan el receptor Eph B4 (Adams, RH y Alitalo K. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; 8: 464-478).

Este grupo de moléculas son las responsables de la regulación de diversas funciones celulares como la morfología, migración, repulsión, adhesión e invasión celular modificando la organización del citoesqueleto e influenciando las actividades de integrinas y otras moléculas de adhesión intracelulares (Pasquale, EB. Cell 2008; 133:38-52). Estas actividades dependen de la interacción de los receptores Eph expresados en una célula con la correspondiente ephrin expresada en otra, generando señales bidireccionales que afectan a cada una de las células implicadas. La señalización procedente del receptor Eph se denomina “directa”, (del inglés “*forward*”) y depende del dominio tirosin quinasa presente en su región citoplásmica, el cual tiene capacidad de autofosforilarse y fosforilar a otras proteínas, y de la asociación del receptor con otras moléculas efectoras. Por su parte, el ligando ephrin B genera otra señalización denominada “inversa” (del inglés “*reverse*”) dependiente por un lado de la fosforilación de varias tirosinas presentes en su región citoplásmica, llevada a cabo por quinasas de la familia Src y otros receptores tirosin quinasa, y, por otro lado, de otras proteínas asociadas. Además, la mayoría de los receptores Eph y las ephrins B presentan un sitio de unión a dominios PDZ en sus regiones citoplásmicas que es importante para realizar las funciones fisiológicas, particularmente de las ephrins B (Mäkinen, T *et al.* Genes Dev. 2005; 19:397-410).

Estudios de inactivación de los genes que codifican para el Eph B4 y para la ephrin B2 en ratones transgénicos sugieren un papel fundamental de ambas

proteínas en el desarrollo del sistema vascular. Ratones deficientes para estos genes presentan una angiogénesis alterada que es letal en estado embrionario (Wang, HU *et al.* Cell 1998; 93:741-753; Adams, RH *et al.* Genes Dev. 1999; 13:295-306), mientras que el estudio de ratones que expresan ephrin B2 con mutaciones en sitios activos de señalización demostró que esta proteína controla el crecimiento angiogénico y linfoangiogénico a través de la regulación de la vía de señalización del VEGF (Wang, Y *et al.* Nature 2010; 465:483-6; Sawamiphak S *et al.* Nature 2010; 465:487-91).

5
10 En WO2007/127506 y en WO2010/019565 se describen anticuerpos contra ephrin B2. En WO2007/127506 se demuestra que los anticuerpos descritos bloquean la señalización entre ephrin B2 y Eph B4 y presentan un efecto inhibitorio de la angiogénesis, capaz de disminuir el volumen tumoral en un modelo animal.

15 Sin embargo, la necesidad de nuevos agentes terapéuticos capaces de controlar la angiogénesis continúa existiendo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 La presente invención aporta un nuevo agente terapéutico capaz de controlar la angiogénesis y se refiere a un nuevo anticuerpo contra ephrin B2, con una secuencia distinta a la de los anticuerpos descritos hasta la fecha y una alta especificidad, capaz de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos y de impedir considerablemente el crecimiento de tumores. Los anticuerpos contra ephrin B2 descritos en WO2007/127506 son capaces de inhibir la angiogénesis, pero no se describe un efecto inhibitorio de la linfoangiogénesis.

30 La presente invención se basa en anticuerpos que reconocen y se unen específicamente a la ephrin B2 y se refiere a dichos anticuerpos y a composiciones y métodos basados en ellos, que supone una herramienta

terapéutica y diagnóstica importante contra aquellas patologías asociadas a la ephrin B2.

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a nuevos anticuerpos específicos contra ephrin B2 que tienen actividad antiangiogénica y antilinfoangiogénica, y son capaces de inhibir el crecimiento de tumores sólidos.

10 Esta invención aporta una nueva solución al problema de controlar enfermedades que cursan con trastornos de la angiogénesis, como es, por ejemplo, el cáncer.

15 Como han demostrado los inventores, el anticuerpo B11 que aquí se describe reconoce específicamente la ephrin B2 de manera que inhibe su unión al receptor Eph B4 lo que, en ensayos *in vitro*, inhibe la formación de túbulos y la capacidad migratoria de células endoteliales (HUVEC) y, en ensayos *in vivo* con células de carcinoma de páncreas, pulmón y colon, produce una reducción considerable en el número de vasos sanguíneos y linfáticos en los tumores. Además, los inventores han observado que el anticuerpo de la presente
20 invención es capaz de retrasar considerablemente el crecimiento tumoral y de provocar la disminución del tamaño de los mismos. Los inventores han demostrado que el anticuerpo B11 bloquea la interacción de la ephrin B2 a Eph B4 tanto *in vitro* como en células en cultivo, donde se muestra además cómo el anticuerpo es capaz de inhibir la señalización de la ephrina a través de su
25 receptor (ver figura 5 de la presente memoria).

El anticuerpo 2B1 es también capaz de inhibir la formación de túbulos y la capacidad migratoria de células endoteliales (HUVEC) y de reducir el número de vasos sanguíneos y linfáticos en los tumores en ensayos *in vivo* El
30 anticuerpo 2B1 no compite con el receptor Eph B4 en los ensayos de Biacore™ ni en los ensayos celulares de bloqueo de Eph B4, como muestra la figura 5 de la presente memoria.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido aislado caracterizado porque:

- a. comprende una secuencia aminoacídica de al menos un 76% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y
- 5 b. reconoce y se une específicamente a la ephrin B2.

Preferentemente, el polipéptido comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. Más preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID
10 NO: 1.

El término “aislado”, tal y como se emplea en la presente descripción, referido a un polipéptido, se refiere a que dicho polipéptido ha sido identificado y separado y/o extraído de un entorno natural.

15

El término “% de identidad de secuencia” con respecto a un polipéptido, se refiere al porcentaje de aminoácidos de la secuencia en cuestión que son idénticos a los aminoácidos de la secuencia con la que se compara, después de alinear dichas secuencias y de introducir espacios, si fuera necesario, para
20 conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin tener en cuenta las sustituciones conservadoras. El alineamiento puede llevarse a cabo de distintas formas, conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo usando las herramientas públicas como son los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un experto en la materia puede determinar los
25 parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento de las secuencias que se comparan.

El término “ephrin B2”, tal y como se emplea en la presente descripción, se
30 refiere, a no ser que se indique específicamente o contextualmente de otra forma, a cualquier polipéptido natural o a cualquier variante de la proteína ephrin B2. El nombre de esta proteína es el acrónimo de “*erythropoietin*

producing hepatoma receptor interactors”, aunque también puede ser llamada ephrina o efrina. Un polipéptido natural puede ser una forma naturalmente truncada o secretada, como por ejemplo el dominio extracelular, o cualquier variante natural como por ejemplo las distintas formas alternativas de “*splicing*”,
5 o cualquier variante alélica.

Preferentemente, el polipéptido es un anticuerpo. Más preferentemente, el anticuerpo es humano. Preferentemente, el isotipo del anticuerpo humano es IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgA.

10

Los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina” se emplean en su sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos (siempre que presenten la actividad biológica deseada) y pueden incluir fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o
15 madurado por afinidad. Un “anticuerpo humano” es aquel cuya secuencia aminoacídica corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser fragmentos variables monocadena (scFv, del inglés “*single chain variable Fragment*”). El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables de los anticuerpos difieren bastante en su secuencia, y son las secuencias responsables de la unión específica de cada anticuerpo a su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera homogénea
20 a lo largo de todo el dominio variable de los anticuerpos. Esta variabilidad se concentra en tres segmentos llamados CDR (del inglés, “*complementarity-determining regions*”) o regiones hipervariables, presentes en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más conservadas de los dominios variables reciben el nombre de marco (del inglés,
25 “*framework*”). Los CDR de ambas cadenas (pesada y ligera) contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno. El fragmento variable o “Fv” es el fragmento mínimo de un anticuerpo que contiene un sitio completo de
30

reconocimiento y unión a antígeno. Un fragmento variable monocadena puede presentar un dominio variable de cadena pesada y otro dominio variable de cadena ligera unidos covalentemente por un péptido que permite que las cadenas pesada y ligera puedan asociarse para formar la estructura del sitio de unión a antígeno. Un Fv puede ser también de dos cadenas. En cualquier caso, incluso un solo dominio variable, con tres CDR únicamente, es suficiente para reconocer y unir específicamente un antígeno, aunque con menor afinidad.

Las cadenas ligeras de los anticuerpos o inmunoglobulinas de vertebrados pueden ser de dos tipos, llamados kappa y lambda, según sean las secuencias aminoacídicas de sus dominios constantes. Según cuáles sean las secuencias aminoacídicas de los dominios constantes de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se asocian a distintas clases o tipos. Hay cinco clases o tipos principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Además, algunos de ellos se dividen en subclases o isotipos, como por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Además, los dominios constantes de las cadenas pesadas de las distintas clases e inmunoglobulinas reciben el nombre de alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente.

Un fragmento de anticuerpo puede ser cualquier parte del anticuerpo que mantenga la función del anticuerpo completo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos son Fv, Fab (fragmentos de unión a antígeno), Fab2 (fragmentos con dos sitios de unión a antígeno), todos ellos sobradamente conocidos por un experto en la materia. Los fragmentos variables monocadena (scFv) comprenden los dominios V_H (dominio variable de la cadena pesada) y V_L (dominio variable de la cadena ligera) del anticuerpo, estando estos dominios en una única cadena polipeptídica. Otros formatos de los anticuerpos de la presente invención pueden ser los conocidos como minianticuerpos o "*minibodies*", que comprenden un scFv y una región constante de tipo CH3, o los llamados scFv-Fc, que comprenden un scFv y las regiones constantes CH2 y CH3. Estos formatos aumentan el peso molecular de los scFv, evitan su

rápida eliminación por el riñón y pueden ser muy útiles para el uso de un scFv en técnicas de imagen.

5 El término “antígeno” se refiere a un antígeno predeterminado al que el anticuerpo es capaz de unirse de manera selectiva. El antígeno puede ser un polipéptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un lípido, un hapteno u otra molécula natural o sintética. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido.

10 Los inventores de la presente invención han estudiado la afinidad de los anticuerpos B11 y 2B1 por la ephrin B2, encontrando que B11 tiene una alta afinidad por el antígeno, siendo la constante de afinidad (K_D) de 110 nM, mientras que 2B1 presenta una menor afinidad, siendo la K_D de 630 nM. La afinidad de la unión entre el sitio de reconocimiento y unión de un anticuerpo y su antígeno tiene que ver con la fuerza de la suma del total de las interacciones
15 no covalentes entre ambos. La afinidad de una molécula por otra puede representarse generalmente por la constante de afinidad, también llamada constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse por métodos habitualmente conocidos, como por ejemplo, pero sin limitarse, con los métodos descritos en esta memoria.

20

Cuando un anticuerpo presenta baja afinidad por su antígeno, suele unirse a él más despacio y se disocia con facilidad. De cara a mejorar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno, pueden emplearse técnicas bien descritas en la bibliografía para “madurar la afinidad” (Marks *et al.* BioTechnology 1992.
25 10:779:783; Barbas, CF *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994 26; 91:3809-13). Estas técnicas pueden ser, entre otras, el “barajado” (del inglés “shuffling”) de los dominios V_H y V_L , o la mutagénesis aleatoria (del inglés “*random mutagenesis*”).

30 En una realización preferida de la invención, el polipéptido además comprende un péptido señal. Preferentemente, el péptido señal es SEQ ID NO: 6, el péptido señal de la pectato liasa bacteriana de *Erwinia carotovora* conocido

como pelB. Este péptido señal permite que el scFv se localice en el periplasma, donde se pliega correctamente gracias al entorno oxidante.

Un péptido señal es una pequeña secuencia de entre 3 y 60 aminoácidos que dirige el transporte de un polipéptido o proteína hacia una localización subcelular determinada, como puede ser el retículo endoplásmico, la mitocondria o el núcleo. El péptido señal puede dirigir también el transporte de la proteína fuera de la célula, lo que podría equivaler a su secreción o a su transporte al periplasma celular, en el caso de células como *Escherichia coli*.
 5 Algunos ejemplos de péptido señal para dirigir la secreción de un polipéptido son pelB, still, ecotina, lamB, herpes GD, 1pp, fosfatasa alcalina, invertasa, factor alfa y la secuencia líder de la proteína A.
 10

En una realización preferida de la invención, el polipéptido además comprende al menos un marcador. Preferentemente, el marcador se selecciona de la lista que comprende: c-myc, FLAG, HA, cadena de histidinas, GST, biotina, VSV-G, HSVtk, V5, biotina, avidina, estreptavidina, proteína de unión a maltosa y una proteína fluorescente. Más preferentemente, el marcador es una cadena de histidinas, c-myc o ambos. Preferentemente, la cadena de histidinas comprende entre 4 y 12 histidinas. Más preferentemente, la cadena de histidinas comprende 6 histidinas. En una realización preferida de la invención, el polipéptido comprende los marcadores c-myc y una cadena de histidinas. En una realización preferida de la invención, la secuencia aminoacídica del polipéptido es SEQ ID NO: 7.
 15
 20

El término "marcador", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un péptido marcador o a una proteína marcadora, que permiten la identificación de la proteína de interés cuando son producidos junto con dicha proteína como proteína de fusión. El péptido marcador o la proteína marcadora sirven para la identificación y/o la localización de la proteína de interés porque dichos marcadores corresponden a sitios de unión a determinadas moléculas o átomos, como la cadena de histidinas, la GST, la avidina o la estreptavidina, o
 25
 30

porque son fácilmente detectables por técnicas inmunoquímicas, como hemaglutinina, VSV-G, HSVtk, FLAG, V5 o myc, o porque son fácilmente observables, como las proteínas fluorescentes.

5 El péptido marcador VSV-G pertenece a la glicoproteína del virus vesicular de la estomatitis. El péptido marcador HSVtk pertenece a la timidina quinasa del virus del herpes simple 1. El péptido FLAG es un epítipo de 8 aminoácidos diseñado específicamente como marcador de proteínas recombinantes. V5 es un pequeño epítipo presente en las proteínas P y V del paramixovirus del virus
10 de simio 5 (SV5). El epítipo myc tiene 10 aminoácidos y es parte de la secuencia del factor de transcripción c-myc humano.

Otra realización de la invención es un anticuerpo cuya secuencia aminoacídica comprende el polipéptido del primer aspecto de la invención.

15

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para el polipéptido del primer aspecto de la invención. Preferentemente, el ácido nucleico es un vector. Más preferentemente, el vector es un vector de expresión.

20

Un ácido nucleico o polinucleótido es un polímero de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero de ADN o ARN por una
25 polimerasa o por una reacción sintética.

El término "codifica" se refiere al código genético que determina cómo una secuencia de nucleótidos se traduce en un polipéptido o una proteína. El orden de los nucleótidos de una secuencia determina el orden de los aminoácidos a
30 lo largo de un polipéptido o una proteína.

Un vector es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente una vez son introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano o los vectores episomales de mamíferos. Otros vectores pueden integrarse en el genoma de la célula huésped y replicarse así junto con el genoma celular. Un vector de expresión es aquel capaz de dirigir la expresión de genes a los que se ha ligado de manera operativa. Un vector de expresión se usa para la traducción y la transcripción de un gen de interés, normalmente controlado por un promotor. Un promotor es una secuencia de nucleótidos que controla la traducción del gen de interés. El promotor está operativamente unido al gen de interés. “Operativamente unido” se refiere a la relación funcional y a la localización de la secuencia del promotor con respecto al gen de interés, por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. En general, un promotor operativamente unido está contiguo a la secuencia de interés. Sin embargo, un potenciador no tiene que ser contiguo a la secuencia de interés para controlar su expresión.

El término “origen de replicación”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una secuencia de nucleótidos donde se forma una horquilla de replicación y donde se inicia la replicación del ADN.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende el vector del segundo aspecto de la invención. La célula puede ser procariota, por ejemplo, pero sin limitarse, la célula puede ser una bacteria como *E. coli* que se

usa para producir el anticuerpo de la invención. La célula puede ser eucariota, como por ejemplo, pero sin limitarse, una levadura o una célula de insecto, que se usa para producir el anticuerpo de la invención. La célula puede ser eucariota y usarse para terapia celular, o puede ser una célula que ha
5 incorporado el vector del segundo aspecto de la invención mediante terapia génica.. En una realización preferida de la invención, la célula es una célula de mamífero. Una célula de mamífero es cualquier célula cuya especie pertenece al Reino *Animalia*, Filo *Chordata*, Subfilo *Vertebrata* y Clase *Mammalia*.

10 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de obtención del polipéptido del primer aspecto de la invención, que comprende las etapas:
(a) expresar el vector del segundo aspecto de la invención en una célula y (b) purificar el polipéptido expresado en la etapa (a).

15 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la célula es procarionota. En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la célula es eucariota.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método de detección y/o
20 cuantificación de la ephrin B2 que comprende las etapas:
(a) poner en contacto una muestra biológica aislada con el polipéptido del primer aspecto de la invención y (b) detectar y/o cuantificar el complejo formado por la ephrin B2 y dicho polipéptido en la muestra empleada en (a).

25 Una realización preferida del quinto aspecto de la invención es un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a la expresión de la ephrin B2 que comprende las etapas:
(a) poner en contacto una muestra biológica aislada con el polipéptido del
30 aspecto primero de la invención, (b) detectar y/o cuantificar el complejo formado por la ephrin B2 y dicho polipéptido en la muestra empleada en (a), (c) comparar los niveles de ephrin B2 detectados con los niveles control y (d)

asociar el resultado de dicha comparación a la presencia o ausencia de la enfermedad.

Una enfermedad asociada a la expresión de la ephrin B2 puede ser entre otras,
 5 cualquier enfermedad que curse con una desregulación de la angiogénesis,
 como pueden ser enfermedades tanto neoplásicas como no neoplásicas. Las
 enfermedades no neoplásicas que cursan con una desregulación de la
 angiogénesis incluyen, pero no se limitan: hipertrofia aberrante, artritis, artritis
 reumatoide, soriasis, sarcoidosis, aterosclerosis, retinopatía diabética,
 10 retinopatía proliferativa, glaucoma neovascular, degeneración macular
 asociada al envejecimiento, edema macular diabético, neovascularización
 corneal, meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasia tiroidea,
 inflamación crónica, inflamación de pulmón, sepsis, edema cerebral,
 inflamación sinovial, formación hipertrófica del hueso, osteoartritis, ovario
 15 poliquístico, endometriosis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa,
 articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, esclerodermia, tracoma,
 sinovitis, dermatitis, preclampsia (WO2007/127506).

Una muestra biológica aislada es una muestra aislada de un organismo como
 20 el cuerpo humano o animal y puede provenir de un fluido fisiológico y/o
 cualquier célula o tejido de un organismo. La muestra biológica puede ser un
 tejido, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia o un aspirado por aguja fina.
 En una realización preferida, la muestra biológica aislada en la etapa (a) es un
 fluido biológico. El fluido biológico puede incluir fluidos excretados o secretados
 25 del cuerpo, así como fluidos que normalmente no lo son. El fluido biológico
 puede incluir, aunque sin limitarse, líquido amniótico que rodea el feto, humor
 acuoso, fluido intersticial, linfa, leche materna, moco (incluyendo el drenaje
 nasal y la flema), saliva, sebo (grasa de la piel), suero, sudor, lágrimas, orina,
 líquido pericárdico, sangre y plasma sanguíneo. En una realización más
 30 preferida, el fluido biológico es sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo.
 La muestra biológica aislada en la etapa (a) del método de la invención puede

ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o embebida en parafina.

La expresión “detectar y/o cuantificar” el complejo formado por la ephrin B2 y el polipéptido del primer aspecto de la invención en una muestra biológica
5 aislada, tal y como se emplea en la presente descripción, hace referencia a la detección de la presencia y/o a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a
10 la medida de la cantidad o la concentración del complejo formado por la ephrin B2 y el polipéptido del primer aspecto de la invención, basada en una señal que se obtiene directamente de dicho complejo y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de complejo presentes en la muestra. Dicha señal, a la que también podemos referirnos como señal de
15 intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del complejo. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del complejo) o un sistema de medida biológica (por ejemplo, la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción
20 enzimática).

El término “cantidad” se refiere, pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de complejo formado por la ephrin B2 y el polipéptido del primer
25 aspecto de la invención así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con el complejo, o que pueda derivarse de él. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas del complejo, obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o
30 parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta.

La detección, tal y como es entendida por un experto en la materia, no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El término “comparar”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere, pero no se limita, a la comparación de la cantidad de complejo formado por la ephrin B2 y el polipéptido del primer aspecto de la invención de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de complejo de una muestra de referencia, que recibe el nombre de control. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente junto con la muestra biológica problema. La comparación puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso del polipéptido del primer aspecto de la invención para preparar un medicamento. En una realización preferida de la invención, el medicamento se usa para inhibir la angiogénesis. Preferiblemente, se usa para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una condición patológica asociada a la angiogénesis. Más preferiblemente, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un tumor o del cáncer.

Una condición patológica asociada a la angiogénesis puede ser cualquier neoplasia, así como otras enfermedades no neoplásicas, como por ejemplo, pero sin limitarse, las descritas en WO2007/127506.

5 En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, el tumor o el cáncer es sólido. Preferiblemente, el cáncer es de páncreas, colon o pulmón. Un tumor o un cáncer se dice que es sólido cuando es una masa de tejido que no contiene cavidades ni líquido. Según el tipo celular, los tumores sólidos reciben distintos nombres, como sarcoma, carcinoma o linfoma.

10

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el polipéptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico o el vector del segundo aspecto de la invención, o la célula del tercer aspecto de la invención. En una realización preferida del séptimo aspecto de la invención,
15 la composición es una composición farmacéutica. Preferiblemente, se caracteriza porque además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Además el excipiente debe ser farmacológicamente aceptable.

Un "excipiente" es un componente de una composición farmacéutica que no es
20 un compuesto activo sino un diluyente, un vehículo o un relleno, entre otros, que se considera "farmacéuticamente aceptable" cuando es seguro, no es tóxico y no presenta efectos adversos. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del compuesto, lo estabiliza o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar
25 sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de
30 presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción

en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

5 El término excipiente “farmacológicamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra. Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, debe ser compatible con dichos componentes

10

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente

15

20 aceptable es el diluyente.

En otra realización aún más preferida, la composición farmacéutica además comprende otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden

25 existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico. El término “principio activo” es toda materia, cualquiera que sea su origen humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

30

En una realización preferida del séptimo aspecto de la invención, la composición farmacéutica además comprende un agente antiangiogénico. Un

agente antiangiogénico es una molécula capaz de inhibir la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular indeseable, directa o indirectamente. Ejemplos de agentes antiangiogénicos son aquellas moléculas capaces de bloquear un agente angiogénico, como son por ejemplo anticuerpos contra VEGF, contra el receptor de VEGF o pequeñas moléculas que bloqueen la vía de VEGF, todos ellos bien descritos y conocidos.

En una realización preferida del séptimo aspecto de la invención, la composición farmacéutica además comprende un agente quimioterapéutico. Un agente quimioterapéutico es un compuesto útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de fármacos quimioterapéuticos son compuestos citotóxicos como las antracilinas, daunorubicina, adriamicina, derivados de docetaxel, alcaloides de la vinca, vincristina, carmustina, cisplatino, fluorouracilos, compuestos citostáticos como los inhibidores de poliamina, tamoxifeno, prodasona o sandostatina, o compuestos que inducen la apoptosis como el butirato sódico o la mitomicina C, antibióticos como las penicilinas, betalactaminas, cefalosporinas, ciclinas, aminoglucósidos, macrólidos o sulfamidas, o anitvirales como el AZT, inhibidores de proteasas o aciclovir, retrovir o foscarnet.

Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de la composición del séptimo aspecto de la invención para preparar un medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento se usa para inhibir la angiogénesis. Preferiblemente, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una condición patológica asociada a la angiogénesis. Más preferiblemente, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un tumor o del cáncer. En una realización preferida, el tumor o el cáncer es sólido. Preferiblemente, el cáncer es de páncreas, colon o pulmón.

En una realización preferida del octavo aspecto de la invención, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad que, administrada en dosis

y durante el período de tiempo necesario, es efectiva a la hora de conseguir el resultado profiláctico o terapéutico deseado. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” del polipéptido o composición farmacéutica de la invención puede variar con el estadio de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y se refiere a una cantidad que no presenta efectos adversos ni toxicidad y es capaz de alcanzar el efecto profiláctico o terapéutico deseado. Un “individuo” es un vertebrado. Preferiblemente, el vertebrado es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un humano. Entre los mamíferos se incluyen, pero sin limitarse, los animales de granja (como las vacas), animales que participan en deportes, mascotas (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. Según una realización aún más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de

administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral

- 5 Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus
10 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la
15 presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Expresión de los clones seleccionados en *E. coli*. Análisis mediante
20 electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie de la expresión de los scFvs seleccionados frente a ephrin B2 (clones 2B1, A1, B11 y E4) en *E. coli* (Extracto total) y de la correspondiente fracción periplásmica aislada mediante choque osmótico suave (Periplasma). Los pesos moleculares se señalan a la izquierda de la figura en kDa.

25

Fig. 2. Los clones B11 y 2B1 se purifican en mayores cantidades. Análisis de las purificaciones de los scFvs A1, B11, E4 y 2B1 específicos de ephrin B2 mediante electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie. Los scFvs presentes en los respectivos extractos periplásmicos
30 se purificaron mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ inmovilizado. En la figura se muestran las distintas fracciones de elución de las cromatografías de cada scFv. Los pesos moleculares se indican en kDa.

Fig. 3. Los clones B11 y 2B1 son más específicos. Determinación de la especificidad de los scFv anti-ephrin B2 seleccionados frente a las distintas ephrin B por *immunoblot*. Las proteínas recombinantes comerciales ephrin B1-Fc (EB1) de ratón, ephrin B2-Fc (EB2) de ratón y ephrin B3-Fc (EB3) humana se separaron electroforéticamente y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, se analizó la reactividad de los clones B11 y 2B1 junto con un anticuerpo comercial anti-ephrin B2 como control (C). Los pesos moleculares se indican a la izquierda de la figura en kDa.

Fig. 4. Análisis de afinidad de los scFv anti-ephrin B2 mediante Biacore™. Los sensogramas representan la respuesta frente al tiempo (s) en las correspondientes a las curvas de unión del clon B11 (A) a ephrin B2 inmovilizada utilizando cuatro concentraciones diferentes (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 μ M) y del clon 2B1 (B) a concentraciones de 30, 20, 10 y 7,5 μ M, a partir de los cuales se calcularon las respectivas constantes de afinidad (K_D), siendo K_D de 110 nM para el clon B11 y de 630 nM para el clon 2B1.

Fig. 5. Estudio del bloqueo de la unión de ephrin B2 a Eph B4. A. Gráfica que muestra el porcentaje de unión de ephrin B2 a Eph B4. Ensayos de inhibición de la unión de ephrin B2 a Eph B4 en presencia de los scFv anti-ephrin B2 mediante resonancia de plasmón superficial. Diluciones seriadas de los scFv B11 (●) ó 2B1 (○) se mezclaron con ephrin B2 y se inyectaron sobre Eph B4 inmovilizado en un chip. La cantidad relativa de ephrin B2 unida a EphB4 se midió inmediatamente después de la inyección de cada muestra y se representó en función de la concentración de scFv. La figura muestra los valores promedios de cada concentración de scFv con barras de error indicando la desviación estándar (n=3). **B.** El scFv B11 es capaz de bloquear la interacción entre ephrinB2 y su receptor EphB4 en un ensayo celular. Análisis de la fosforilación de las tirosinas del receptor Eph B4 en células HUVEC en respuesta a la estimulación con ephrin B2 sobreexpresada en la superficie de células HEK293. Células HUVEC y células HEK293 que sobreexpresan ephrinB2 se cocultivaron durante 20 minutos en presencia o ausencia de los

scFv anti-ephrinB2. Tras inmunoprecipitar el receptor Eph B4, se analizó la cantidad total de esta proteína (panel inferior) y su nivel de fosforilación (panel superior), mediante inmunoblot.

5 **Fig. 6. Efecto inhibitorio de B11 y 2B1 en la formación de estructuras tubulares *in vitro* por células endoteliales HUVEC en Matrigel.** Microfotografías (aumento 4x) representativas de la formación de túbulos a las 6 horas de cultivar células HUVEC sobre Matrigel en presencia de B11, 2B1 o un scFv irrelevante como control negativo (C-). Como control positivo se
10 empleó VEGF. La gráfica muestra la cuantificación de la formación de túbulos. Cada tratamiento fue repetido al menos tres veces y los valores correspondientes (media +/- desviación estándar) se representan como el porcentaje de túbulos formados en presencia de los anticuerpos ensayados con respecto al control sin ningún tratamiento. *=p<0,0001.

15

Fig. 7. Análisis de la inhibición de la migración celular lateral mediante ensayos de cicatrización de heridas *in vitro*. Se crecieron células HUVEC hasta confluencia y se hizo una herida en la monocapa celular. A continuación, las células se incubaron en medio sin suero en ausencia (control) o en
20 presencia de VEGF como estímulo de migración. La migración lateral de las células se monitorizó durante 24 horas en presencia de los scFv anti-ephrin B2, B11 ó 2B1, o de un scFv irrelevante como control negativo. La figura muestra micrografías representativas (aumento 4x) después de 24 horas del área de la herida en la que se han marcado con líneas discontinuas el área inicial sin
25 células a tiempo 0. La gráfica cuantifica la migración celular a las 24 horas. Cada scFv se ensayó al menos tres veces, y los valores correspondientes (medias +/- desviación estándar) se representaron en función del porcentaje de área migrada con respecto al tiempo 0. *=p<0,001.

30 **Fig. 8. Análisis del efecto inhibitorio en la formación de estructuras tubulares *in vivo*.** Se realizaron implantes de Matrigel en ratones atímicos nu/nu y se valoró la formación de vasos después de 6 días de la implantación

mediante cuantificación de células endoteliales y hemoglobina. **A.** Micrografías representativas (aumento 40x) de cortes histológicos de los correspondientes implantes extirpados después de 6 días y teñidos con el marcador de células endoteliales CD34. **B.** Las gráficas muestran el porcentaje de área positiva para el marcador CD34 (panel izquierdo) y la variación relativa del contenido de hemoglobina en los implantes con respecto al implante control sin VEGF (panel derecho).

Fig. 9. Inhibición del crecimiento tumoral en ratones xenotransplantados con células de carcinoma pancreático (BxPC3) y tratados con B11 ó 2B1. La gráfica muestra la media de los volúmenes tumorales y la desviación estándar en cada punto para cada uno de los grupos (n=8), tratados con 20 mg/kg de B11 (▲), 2B1 (■) o sin tratar (C-) (◆).

Fig. 10. Análisis histopatológico de los tumores xenotransplantados de células de carcinoma pancreático (BxPC3) y tratados con B11 ó 2B1. El análisis se realizó 38 días después de la implantación y 1 día después de la última dosis de anticuerpo. Los tumores se fijaron con formalina y se embebieron en parafina para posteriormente realizar la tinción inmunohistoquímica correspondiente. Las células apoptóticas se detectaron mediante tinción de caspasa 3 activa, la actividad proliferativa se analizó mediante tinción de Ki67, la vascularización se marcó mediante tinción de CD34 y los vasos linfáticos se detectaron mediante tinción de LYVE1. Posteriormente se contaron las células o las áreas positivas y se representaron los valores medios de todos los campos contados junto con sus respectivas desviaciones estándar. *= $p < 0,0001$; **= $p < 0,001$.

Fig. 11. B11 es capaz de inhibir el crecimiento tumoral en ratones xenotransplantados con células de carcinoma de colon (SW620) (A) y células de carcinoma de pulmón (H460) (B). Las gráficas muestran las medias de los volúmenes tumorales (paneles superiores) y las medias de las intensidades de fluorescencia (paneles inferiores) junto con las desviaciones

estándar en cada punto de los grupos tratados con 20 mg/kg de B11 y de los grupos control no tratados.

Fig. 12. Análisis de la biodistribución de B11 y 2B1 y localización de las masas tumorales. Ratones atímicos nu/nu fueron xenotransplantados con células H460 de carcinoma de pulmón que expresan de manera estable la proteína fluorescente mCherry. Cuando el tumor alcanzó un tamaño detectable tanto macroscópicamente como por intensidad de fluorescencia a 610 nm, se administraron por vía intravenosa los correspondientes scFv conjugados al fluorocromo AlexaFluor®750. **A.** Imágenes de las regiones dorsales a las 0,5; 2; 6; 24 y 48 horas después de la administración de los scFv. La localización de los tumores se indica con una flecha. **B.** Intensidad de fluorescencia a 750 nm de los tumores extirpados a 6 y 48 horas después de la administración de los scFv B11 y 2B1 marcados con AlexaFluor®750 y el control negativo (C-) tratado con PBS.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad del anticuerpo contra la ephrin B2 de la invención, así como su efectividad para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos.

EJEMPLO 1: Identificación y caracterización de nuevos anticuerpos humanos frente a la ephrin B2.

A partir una genoteca de anticuerpos humanos expresados en la superficie de fagos M13 y mediante sucesivas rondas de selección frente a la región extracelular de la ephrin B2, expresada en células de mamífero y purificada mediante cromatografía de afinidad, se obtuvo una colección de clones de fagos que reaccionaron positivamente con el antígeno ephrin B2 por ELISA. Estos clones se secuenciaron con cebadores específicos y se identificaron 4

fragmentos variables monocadena (scFv) de secuencias diferentes entre sí, tanto en V_H (cadena variable pesada) como en V_L (cadena variable ligera), denominados A1, B11, E4 y 2B1. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de la expresión y purificación de cada uno de los scFv seleccionados. Para ello se

5 subclonaron en vectores pET28b bajo el promotor de la T7 ARN polimerasa con el objetivo de dotar a los fragmentos de una cola de histidinas para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad. Se generaron los vectores recombinantes y se transformaron en la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) para posteriormente inducir su expresión con IPTG. Se preparó la fracción

10 periplásmica mediante choque osmótico suave y se analizó la presencia de los scFv por SDS-PAGE (Fig. 1). A continuación, se procedió a la purificación de los scFv presentes en las fracciones periplásmicas mediante cromatografía de afinidad con níquel, seguida de un cambio de tampón a PBS por filtración en gel (Fig. 2). El mayor rendimiento se obtuvo en el caso del clon 2B1 (cuya

15 secuencia es SEQ ID NO: 8), seguido del clon B11 (cuya secuencia es SEQ ID NO: 7). Sin embargo, las expresiones de los scFv A1 y E4 fueron tan bajas, que las cantidades que se llegaron a obtener no fueron suficientes para una caracterización posterior de estos anticuerpos (Fig. 2). Por tanto, los clones B11 y 2B1 fueron finalmente los seleccionados para analizar su reactividad.

20 Los ensayos funcionales, mediante técnicas de ELISA, demostraron que los anticuerpos se expresaron en forma funcionalmente activa y reconocían específicamente a su antígeno diana, la ephrin B2.

La especificidad de los dos anticuerpos se comprobó mediante inmunoblot

25 (*Western blot*) y ELISA analizando la reactividad de B11 y 2B1 con otros componentes de la familia de las ephrins B: la ephrin B1 y la ephrin B3, en formas recombinantes comerciales, en comparación con la reactividad con la ephrin B2 (Fig. 3). Como control, se utilizó un anticuerpo anti-ephrin B2 comercial (R&D). Ambos anticuerpos, B11 y 2B1, reconocieron únicamente a la

30 ephrin B2, demostrando su elevada especificidad por esta proteína, incluso mayor que el anticuerpo comercial que reconoce también a las ephrins B1 y B3. Estos resultados se confirmaron por ELISA.

Selección de fragmentos variables monocadena (scFv) de anticuerpos específicos de ephrin B2 a partir de genotecas de fagos

Se utilizó la tecnología de despliegue de proteínas en la superficie de fagos (en inglés, *Phage display*) con una genoteca de anticuerpos humanos procedente de individuos no inmunizados de $1,5 \times 10^{10}$ scFv. La primera ronda de inmunoselección (en inglés, *panning*) se realizó con la región extracelular de la ephrin B2 fusionada al dominio Fc de la IgG humana, expresada y purificada en células de mamífero, como antígeno inmovilizado en placas de ELISA (Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, del inglés, "*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*", Maxisorp, Nunc) a razón de 1 µg/pocillo durante 16 horas a 4º C en PBS (Solución salina de fosfato, del inglés "*Phosphate Buffer Saline*"). Tras 3 lavados del pocillo con PBS se llevó a cabo una etapa de bloqueo con 2% de leche en PBS durante 2 horas a 37º C, seguida de una incubación de la genoteca durante 2 horas a 37º C. Los fagos unidos no específicamente se eliminaron por lavados sucesivos con PBS-0,1% Tween, mientras que los fagos específicos de antígeno se eluyeron con 100 µl de tripsina. Se infectaron células de *Escherichia coli* de la cepa TG1 (MRC Geneservices) en crecimiento exponencial (Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) de 0,4) durante 30 minutos a 37º C con los fagos eluidos. Se sembraron las bacterias infectadas en placas de TYE (de triptona y extracto de levadura, del inglés, "*Tryptone, Yeast Extract*") suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 1% (v/v) y se dejaron crecer durante 16 horas a 37º C. A continuación, se recogieron las bacterias de las placas con medio 2xTY (16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl) suplementado con glicerol al 15% y se diluyeron 50 µl de las bacterias recogidas en 50 ml de medio de cultivo 2xTY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 1%; se incubaron los cultivos hasta alcanzar la fase exponencial y se infectaron las células con $2,5 \times 10^{11}$ fagos *helper* KM13 (MRC Geneservices). Tras 30 minutos de incubación a 37º C, se centrifugaron los cultivos, se resuspendieron los precipitados en el mismo volumen de medio

2xTY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina y glucosa al 0,1% y se crecieron durante toda la noche a 30° C.

5 Los fagos de cada ronda de selección se precipitaron a partir del medio de cultivo. Para ello se centrifugaron los cultivos a 3.300 x g durante 15 minutos y se añadieron 10 ml de PEG (polietilenglicol)/NaCl a 40 ml de sobrenadante y se dejaron 1 hora en hielo. Se centrifugaron a 3.300 x g durante 30 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados se resuspendieron en 2 ml de PBS y se centrifugaron a 11.600 x g durante 10 minutos. Se recuperaron los
10 sobrenadantes y los fagos se utilizaron para la siguiente ronda de selección, similar a la anteriormente descrita, con la particularidad de que se utilizaron cantidades decrecientes de antígeno para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Los fagos unidos en esta segunda ronda se amplificaron y se volvieron a someter a una tercera ronda de selección para conseguir un
15 enriquecimiento de aquéllos que portan un scFv reactivo contra la ephrin B2.

ELISA de fagos

20 Se realizaron ELISAs de fagos para valorar el grado de enriquecimiento en fagos específicos de ephrin B2, resultantes de cada ronda de selección. Placas de ELISA flexibles (Falcon, BD Biosciences) se tapizaron con 0,3 µg de ephrin B2-Fc y una proteína irrelevante como control negativo, en PBS a 4° C durante 16 horas. Después de varios lavados con PBS, las placas se bloquearon con 2% de leche en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de la
25 incubación con las diferentes diluciones de los fagos de cada ronda de selección en PBS-2% leche durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo los pocillos con PBS-Tween 20 al 0,1% y se incubaron con una dilución 1:5.000 de un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a peroxidasa (HRP) (GE Healthcare) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras cuatro
30 lavados con PBS-0,1% Tween, se revelaron con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Sigma). La reacción colorimétrica se detuvo con ácido sulfúrico 1M y se midió la absorbancia a 450 nm.

Los dos scFv seleccionados, B11 y 2B1, se caracterizaron mediante distintas técnicas. En primer lugar se determinaron las constantes de afinidad de los anticuerpos a la ephrin B2 por medio de la técnica de resonancia de plasmón superficial en un Biacore X, con la región extracelular de la ephrin B2 inmovilizada y distintas diluciones de los scFv purificados. El clon B11 presentó la mayor constante de afinidad, siendo ésta de 110 nM, mientras que la afinidad del clon 2B1 fue más baja, 630 mM (Fig. 4). A continuación, se analizó con la misma técnica la capacidad de los anticuerpos para competir en la unión de la ephrin B2 a su receptor natural Eph B4. Para ello, se inmovilizó Eph B4-Fc en un chip y se midió la unión de la ephrin B2 en presencia de distintas concentraciones de B11 o 2B1. La presencia de B11 bloquea la unión de la ephrin B2 a Eph B4 de manera dependiente de su concentración, con una IC₅₀ de 0,3 µM (Fig. 5), indicando que B11 compite por el mismo sitio de unión que el receptor Eph B4. Sin embargo, el anticuerpo 2B1 no tiene un efecto bloqueante (Fig. 5).

ELISA de fagos monoclonales

Se picaron colonias individuales de la tercera ronda de selección y se crecieron durante toda la noche a 37° C en agitación en 100 µl de medio 2xTY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 1% en placas de 96 pocillos (Sarstedt). Al día siguiente se diluyeron los cultivos 100 veces en el mismo medio y se incubaron durante 2 horas a 37° C en agitación. A continuación, se añadieron 25 µl de medio con 10⁹ fagos *helper* KM13 y se incubaron durante 1 hora a 37° C. Se centrifugaron las bacterias y el precipitado celular se resuspendió en 2xTY suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y se cultivaron durante toda la noche a 30° C. Finalmente, los cultivos se centrifugaron y se utilizaron 50 µl del sobrenadante para hacer el ELISA en las mismas condiciones descritas arriba.

30

Análisis de secuencia

Se amplificaron las secuencias codificadoras de los scFv positivos mediante PCR utilizando los oligonucleótidos o cebadores pelBForward (SEQ ID NO: 2) 5'-CATAATGAAATACCTATTGCCTA-3' y cmcReverse (SEQ ID NO: 3) 5'-CTTATTAGCGTTTGCCATT-3'. Se trataron los productos de PCR con las enzimas ExoI (USB), para eliminar los oligonucleótidos no utilizados, y SAP (USB), para eliminar los dNTP sobrantes, a 37^o C durante 30 minutos y a 80^o C durante 15 minutos, y dichos productos se secuenciaron con ambos oligonucleótidos. Una vez obtenidas las secuencias, se compararon entre sí para determinar el número de clones de secuencia única mediante el programa ClustalW y la herramienta de traducción del servidor ExPASy Proteomics.

Subclonaje de los scFv en pET28b

Para dotar a los scFv seleccionados de una cola de histidinas que facilite su purificación, se clonaron en el vector pET28b (Novagen). Se amplificaron los scFv por PCR mediante los cebadores pET28-scFvMehta 5' (SEQ ID NO: 4) 5'-CAGTCATCATGAAATACCTATTGCCTAC3' y pET28-scFvMehta3' (SEQ ID NO: 5) 5'-CACCGGACTCGAGTGCGGCCCCATTTCAG3' que incluyen dos sitios de restricción RcaI y XhoI, respectivamente, para su posterior clonaje en el vector pET28b, previamente digerido con NcoI, sitio compatible con RcaI y XhoI. La ligación de inserto y vector digeridos se realizó mediante incubación durante toda la noche a 16^o C con la enzima T4 Ligasa (Roche) poniendo una relación molar inserto:vector 3:1. Se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa DH5 α library (Invitrogen) mediante choque térmico y se seleccionaron en placas de LB-Agar (del inglés "*Lysogeny Broth*") con 50 μ g/ml de kanamicina. Se inoculó una colonia positiva de cada construcción en LB suplementado con kanamicina y se cultivó a 37^o C durante toda la noche. Los vectores recombinantes se purificaron con el kit Wizard (Promega) y se verificó la secuencia mediante secuenciación de ADN.

Expresión y purificación de los scFv

Se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) con los plásmidos recombinantes pET28 mediante choque térmico. Se seleccionaron las bacterias transformadas en placas de LB con 50 µg/ml de kanamicina. Se llevó a cabo la expresión de los scFv mediante inducción con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM cuando la DO₆₀₀ de los cultivos fue de 0,6. Se analizaron los niveles de expresión de los scFv mediante geles de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato sódico) seguidos de tinción con azul brillante de Coomassie. Dado que el scFv funcional se concentra en la región periplásmica de las células, se efectuó una lisis de la pared externa de la bacteria mediante choque osmótico suave, resuspendiendo las células en 1/50 volúmenes de tampón TES (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,5 M Sacarosa) suplementado con 20 µg/ml de benzamidina (Sigma) y 10 µg/ml de inhibidor de tripsina de soja (Sigma) y, posteriormente, diluyendo 1,5 veces en tampón 0,2 x TES. Los lisados se dejaron 30 minutos en hielo, se centrifugaron a 16.250 x g durante 10 minutos y se recogieron los sobrenadantes conteniendo la fracción periplásmica.

La purificación de los scFv se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) utilizando columnas de Ni²⁺ HisTrap (GE Healthcare) seguida de un desalado en una columna de filtración en gel HiPrep 26/10 desalting (GE Healthcare) acopladas en tándem en un equipo ÄKTExpress. Como tampón de equilibrado de la columna de afinidad se utilizó 20 mM fosfato sódico pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, y como tampón de elución, el mismo que el de equilibrado con una concentración de imidazol 0,3 M. Este tampón se intercambiò por PBS en la filtración en gel.

Inmunoblot (*Western blot*)

30

Las proteínas recombinantes ephrin B1-Fc de ratón, ephrin B2-Fc de ratón y ephrin B3-Fc humana (R&D) se separaron electroforéticamente en geles de

poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Tras bloquear las membranas con PBS-3% leche en polvo semidesnatada durante 1 hora, se incubaron con las fracciones periplásmicas diluidas 1:5 en PBS-3% leche en polvo durante 16 horas a 4° C. Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anti c-Myc (Sigma) a una dilución 1:1.000 durante 2 horas a temperatura ambiente y anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido 1:5.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. La visualización se realizó mediante incubación con el reactivo ECL (del inglés, “*Enhanced Chemiluminescence*”) GE Healthcare).

10

Análisis de las constantes cinéticas de los scFv

Para el estudio de las constantes de afinidad de los scFv se utilizó la técnica de resonancia de plasmón superficial con el equipo BIAcore X (BIAcore). La ephrin B2-Fc se unió covalentemente a la superficie del chip CM5 (GE Healthcare) previa activación de los grupos carboxilo de la matriz de dextrano del chip con 0,4 M EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) y 0,1 M NHS (N-hydroxysuccinimide) en un ratio 1:1 durante 7 minutos a un flujo de 10 µl/minuto. La proteína ephrin B2-Fc se diluyó hasta 10 µg/ml en acetato sódico 10 mM a pH 4 y 30 µl de esta solución se pasó sobre la superficie del chip a un flujo de 10 µl/minuto en tampón HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% surfactante P20) (GE Healthcare). El exceso de grupos ésteres activados se bloquearon mediante la inyección de etanolamina 1M a pH 8,5 a un flujo de 10 µl/minuto durante 7 minutos. Mediante este protocolo se inmovilizaron aproximadamente 2.000 unidades de respuesta (RU) de ephrin B2.

Para determinar las constantes de afinidad de los scFv, se inyectaron secuencialmente diferentes diluciones de los anticuerpos en orden creciente, a un flujo de 30 µl/minuto. Una vez obtenidos los sensogramas, las constantes de afinidad se calcularon utilizando el programa de evaluación BIAsoftware mediante el modelo de Langmuir 1:1.

Análisis de competición por la unión a Eph B4

La capacidad de los scFv para inhibir la unión de la ephrin B2 a su receptor Eph B4 se analizó mediante un ensayo de unión competitiva por resonancia de plasmón superficial. Eph B4 soluble (R&D) se conjugó a un chip CM5 (GE Healthcare) mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. Diluciones seriadas de cada scFv se mezclaron con una concentración constante (0,2 μ M) de ephrin B2-Fc en tampón HBS-EP y se inyectaron 30 μ l de cada mezcla a un flujo de 20 μ l/minuto sobre el chip recubierto de Eph B4. La cantidad relativa de ephrin B2 unida a Eph B4 se representó en función de la concentración correspondiente de anticuerpo

Bloqueo de la señalización de EphB4 con el scFv B11 anti-ephrin B2

Para analizar la capacidad de los scFv anti-ephrin B2 para bloquear la activación del Eph B4 mediante fosforilación inducida por ephrin B2, se realizó un ensayo celular en el cual se utilizaron células HEK293 que sobreexpresan transitoriamente ephrin B2 para estimular células HUVEC, caracterizadas por expresar altos niveles de Eph B4 pero bajos niveles de ephrin B2. El resultado se muestra en la Figura 5 B. La ephrin B2 expresada en la superficie de las células HEK293 provocó una eficiente fosforilación del Eph B4 en las células HUVEC, tras una incubación de los dos tipos celulares durante 20 minutos. Sin embargo, la presencia del scFv B11 en este proceso causó la inhibición casi completa de la fosforilación del Eph B4, indicando que el tratamiento con el scFv B11 bloquea la interacción entre la ephrin B2 y su receptor Eph B4 en el contexto del contacto directo entre células. Este efecto no se observó al realizar el tratamiento con el scFv 2B1. En el caso del scFv 2B1, los niveles de fosforilación del Eph B4 fueron semejantes a los observados en ausencia de anticuerpos.

30

Ensayo celular de fosforilación de Eph B4

Células HEK-293 crecidas con medio RPM1 (Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino se transfectaron con el plásmido pcDNA3-ephrin B2. Se sembraron $4,5 \times 10^6$ células HEK-293 en un frasco de plástico T-75 (Nunc). Al día siguiente, se preparó una mezcla con 20 μg de pcDNA3-ephrinB2 y 60 μl de reactivo de transfección FUGENE (Roche) en 1 ml de medio OPTIMEM (Invitrogen) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La monocapa celular se lavó varias veces con medio OPTIMEM (Invitrogen) sin suero y se añadió la mezcla ADN-FUGENE. Tras una incubación de 5 horas a 37°C y 5% CO_2 , se retiró el medio y se añadió RPM1 con 5% de suero fetal bovino. A las 48 horas, se levantaron las células transfectadas con PBS-5 mM EDTA y 5×10^6 células se añadieron a una placa P100 (Falcon) con células HUVEC crecidas hasta confluencia en medio EGM bullet kit (Lonza), suplementado con 10% suero fetal bovino en presencia de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los scFv anti-ephrin B2 o en ausencia de ellos. Tras una incubación de 20 minutos a 37°C y 5% CO_2 , las células se lisaron con tampón de lisis (100 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,5% Triton X100) suplementado con cócteles de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (Sigma). El lisado se centrifugó 25 minutos a 16.000xg, 4°C y a continuación, el sobrenadante se incubó durante 2 horas a 4°C con un complejo preformado durante 16 horas a 4°C por un anticuerpo específico frente a Eph B4 (R&D) y Proteína G acoplada a Sepharosa (GE Healthcare). Finalmente, el inmunocomplejo se lavó dos veces con tampón de lisis y se realizó una electroforesis en geles de 7,5% poliacrilamida SDS-PAGE.

La detección de Eph B4 fosforilado se realizó mediante inmunoblot. Para ello, las proteínas inmunoprecipitadas por el anticuerpo anti-Eph B4 y separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (GE Healthcare) y se bloquearon con PBS suplementado con Tween-20 (Sigma) al 0,05% y agente bloqueante Phosphoblocker® (Cell BioLabs, Inc) al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se incubó con el

anticuerpo monoclonal 4G10 anti-fosfotirosina conjugado a peroxidasa (Millipore) diluido 1:2.000 durante 16 horas a 4^o C. La visualización se realizó mediante detección por quimioluminiscencia con SuperSignal® West Femto Substrate (Thermo Scientific). Para la detección del Eph B4 total, la misma
5 membrana se regeneró con el agente ReBlot Plus Strong (Chemicon) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo anti-Eph B4 (R&D) diluido 1:1.000 en PBS, con 0,05% Tween-20 y 5% leche semidesnatada durante 16 horas a 4^o C. Tras varios lavados con PBS con 0,05% Tween-20, la membrana se incubó con un anticuerpo anti-cabra
10 (1:5.000) conjugado con peroxidasa (Dako) durante 2 horas a temperatura ambiente y las bandas se visualizaron con reactivo ECL Plus (GE Healthcare).

EJEMPLO 2: Actividad antiangiogénica de los anticuerpos B11 y 2B1 en células HUVEC *in vitro*.

15

Se analizó el efecto de los anticuerpos B11 y 2B1 sobre la capacidad angiogénica y sobre la migración de células endoteliales. Para ello, se realizaron experimentos de formación de tubos en Matrigel y ensayos de cicatrización *in vitro* con células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana, del inglés "*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*"), respectivamente.
20

En el experimento de formación de tubos en Matrigel, se observó que células HUVEC en presencia de 100 µg/ml del anticuerpo B11 formaban un número de túbulos 2 veces menor que en los controles sin anticuerpo o con un scFv irrelevante (Fig. 6) y, además de verse una disminución en el número de
25 túbulos a las 6 horas de tratamiento, también se observó una mayor disposición de las células en monocapa, es decir se evidenció que se previene la formación de tubos en presencia del anticuerpo. Similares resultados se obtuvieron con el clon 2B1, aunque con una menor capacidad de inhibición comparada con el
30 B11, un 40% con respecto a los controles.

Para determinar el efecto sobre la migración lateral de células HUVEC, se realizó un experimento de cicatrización de monocapa en presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como agente estimulante de la migración. A las 24 horas de haber realizado la herida, el 60% de las células de la monocapa migraron a los espacios libres en el caso de estar presente VEGF o VEGF y un anticuerpo irrelevante en el proceso. Por el contrario, aquellas heridas tratadas con VEGF y B11 o 2B1, únicamente fueron colonizadas por el 25% o el 30% de las células, respectivamente, datos comparables con el número de células migradas en el control negativo (20%), sin estímulo de migración presente (Fig. 7).

Por tanto, se puede concluir de ambos experimentos que los anticuerpos B11 y 2B1, y especialmente el primero, específicos frente a la ephrin B2, presentan capacidad antiangiogénica y son capaces de inhibir la migración de células endoteliales *in vitro*.

Ensayo de formación de estructuras capilariformes en Matrigel

Placas de 24 pocillos se tapizaron con Matrigel (BD Biosciences) y se incubaron a 37° C durante 20 minutos para su gelificación. Seguidamente, se sembraron 5×10^4 células HUVEC sobre la capa de Matrigel en 1 ml de medio completo EGM-2 bullet kit (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino, y se incubaron durante 6 horas a 37° C en presencia de los diferentes anticuerpos a 100 µg/ml. A las 6 horas se estudió el grado de formación de estructuras tubulares mediante el análisis de imágenes digitales obtenidas en un microscopio Axiovert 100 (Zeiss) equipado con cámara fotográfica.

Ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*

Los ensayos de migración celular se realizaron mediante cicatrización de heridas *in vitro*. Células HUVEC se crecieron hasta confluencia en placas de 24 pocillos, después de 1 hora de incubación con medio EGM-2 (Lonza)

suplementado con 0,5% de suero fetal de ternera, se procedió a hacer un raspado lineal con una punta de pipeta y a tomar una fotografía de la zona. Las células se incubaron en ausencia (condiciones control) o presencia de 100 ng/ml de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés “*Vascular Endothelial Growth Factor*”, Peprotech) como estímulo de migración y 100 µg/ml del correspondiente anticuerpo. Al cabo de 24 horas se volvió a tomar una fotografía de la zona, se contaron las células migradas lateralmente hacia la zona de la herida y se determinó el porcentaje de área migrada desde el momento en que se hizo el raspado.

10

EJEMPLO 3: Efecto de los anticuerpos B11 y 2B1 sobre la vascularización de implantes de Matrigel *in vivo*.

Con el objeto de demostrar que los anticuerpos B11 y 2B1 son capaces de inhibir directamente la angiogénesis *in vivo*, se realizó un experimento de implantes de Matrigel suplementados con VEGF (Peprotech) en ratones desnudos atímicos nu/nu, con 6 animales por grupo. La valoración de la formación de redes capilares se llevó a cabo transcurridos 6 días desde la implantación del correspondiente Matrigel, mediante la cuantificación de hemoglobina presente en el implante extirpado y mediante tinción inmunohistológica de CD34, seguido del cálculo de las áreas positivas para este marcador de vasos sanguíneos. El tratamiento con los respectivos anticuerpos se inició por vía intravenosa inmediatamente después de la implantación del Matrigel, en días alternos, hasta alcanzar una dosis final de 300 µg/ratón. Se utilizaron implantes sin VEGF como controles negativos en los cuales no se desarrolló ningún tipo de vascularización (Fig. 8A). Por el contrario, implantes con VEGF e implantes con VEGF y tratados con un scFv irrelevante presentaron una prominente vascularización, considerándose los controles positivos del experimento. Los animales tratados con el anticuerpo B11 mostraron una mínima vascularización, un 95% menor que en los controles positivos, comparable a la que presentaron los animales implantados con Matrigel sin factor de crecimiento, lo que se refleja en una ausencia de

30

células endoteliales positivas para CD34 y de hemoglobina en los implantes (Fig. 8B). El grupo de ratones tratados con el anticuerpo 2B1 mostró una inhibición del 50% en la formación de vasos con respecto a los controles positivos.

5

Ensayo de formación de tubos *in vivo*

Se emplearon ratones atímicos nu/nu de 4 a 6 semanas de edad (Charles River). Para el grupo control, los ratones anestesiados con isofluorano al 2% se
 10 inyectaron con 200 μ l de Matrigel (BD Biosciences). Otro grupo de animales se inyectó con 200 μ l de Matrigel suplementado con 50 ng/ml de VEGF y 375 μ g/ml de heparina (Sigma) en la zona abdominal superior. Inmediatamente después de la implantación de los matrigeles se inicia el tratamiento con los scFv vía intravenosa en días alternos, hasta alcanzar una dosis total de 300
 15 μ g/ratón. A los 6 días, los implantes se extirparon y la formación de nuevos vasos se determinó en función de la concentración de hemoglobina presente y en cortes histológicos teñidos con anti-CD34, marcador de vasos sanguíneos. Para medir la hemoglobina, se tomó una porción de cada implante de Matrigel, se pesó y se homogeneizó en 300 μ l de agua destilada. Tras una
 20 centrifugación a 16.000 x g durante 5 minutos, se tomaron 100 μ l del sobrenadante y se diluyeron 1:1 con sustrato TMB (3,3',5-5'-tetrametilbenzidina) (Sigma). Transcurridos 15 minutos, la reacción colorimétrica se valoró midiendo la densidad óptica a 650 nm. Finalmente, los valores se normalizaron frente al peso del implante.

25

Para el análisis inmunohistoquímico, porciones de los implantes se fijaron en formalina tamponada al 10%, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes en micrótomos de 2,5 μ m de grosor. La recuperación antigénica se llevó a cabo con Tris-EDTA pH 9,0 y las células endoteliales se marcaron con un anticuerpo
 30 monoclonal de rata anti-CD34 (Abcam) diluido 1:75, seguido de un anticuerpo secundario anti-rata marcado con peroxidasa (Biocare Medical). La visualización se realizó mediante tetrahidrocloreuro de 3,3-diaminobenzidina

plus (DAKO) y se contratiñó con hematoxilina. Las células positivas se contaron mediante el sistema AxioVision (Zeiss).

EJEMPLO 4: los anticuerpos B11 y 2B1 inhiben del crecimiento de tumores humanos en ratones atímicos.

Dada la capacidad demostrada de los anticuerpos B11 y 2B1 para afectar la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*, se estudió si también eran capaces de inhibir un proceso altamente dependiente de la angiogénesis como es el crecimiento tumoral. Para ello, se utilizaron tres modelos de xenotransplantes en ratón con células de carcinoma de páncreas (BxPC3), de colon (SW620) y de pulmón (H460). Las células de colon y pulmón expresan constitutivamente la proteína fluorescente mCherry para hacer un seguimiento de la evolución tumoral mediante el análisis de la fluorescencia que emiten. Previamente, se comprobó que ambos anticuerpos, B11 y 2B1, no producían ningún efecto sobre la viabilidad celular *in vitro* en las tres líneas celulares empleadas.

Se implantaron subcutáneamente células BxPC3 a 2 grupos de 8 ratones y una vez que se detectó macroscópicamente la presencia de masas tumorales, se inició el tratamiento vía intravenosa con B11 y 2B1 en días alternos hasta completar la dosis de 20 mg/kg o con PBS como control negativo. Transcurridos 60 días desde la implantación de las células tumorales, se observó que el grupo de ratones tratados con el anticuerpo B11 exhibía una reducción muy significativa del tamaño tumoral, concretamente un 70% de inhibición del crecimiento comparado con el tamaño medio de los tumores del grupo control (Fig. 9). Los ratones tratados con 2B1 mostraron una reducción moderada del crecimiento tumoral, en torno al 35%.

Para estudiar los mecanismos responsables de esta inhibición en el crecimiento neoplásico, se extirparon varios tumores un día después de la finalización del tratamiento con el anticuerpo y se realizó un análisis inmunohistoquímico para valorar el estatus apoptótico, proliferativo,

angiogénico y linfoangiogénico con anticuerpos frente a caspasa 3 activa, Ki67, CD34 y Lyve1, respectivamente (Fig. 10). El número de células apoptóticas en los tumores tratados con B11 aumentó 5 veces con respecto al de los controles. Por el contrario, la diferencia entre el número de células en apoptosis
5 entre los tumores tratados con 2B1 y los controles no fue significativa.

Con respecto al marcador de proliferación Ki67, no se observaron diferencias representativas entre los tumores de animales tratados y los controles, presentando alrededor del 30% de células positivas para Ki67 en los tres
10 grupos.

Cuando se analizó la presencia de vasos sanguíneos mediante medición del área positiva para CD34 en los tumores, se observó una reducción del 80% en los tumores tratados con B11 con respecto a los controles, y del 55% en los
15 tumores tratados con 2B1 con respecto a los controles.

Por último, se analizó la presencia de vasos linfáticos mediante el marcador Lyve1; en aquellos tumores tratados con B11 se observó la ausencia casi completa de vasos linfáticos. En los tumores tratados con 2B1 se observó
20 también una disminución significativa del número de vasos linfáticos, aunque no de forma tan drástica como en el caso de B11.

A continuación se estudió la capacidad antiangiogénica, antilinfoangiogénica e inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo B11 en otros modelos de
25 xenoinjertos siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En el caso de la línea celular SW620 de carcinoma de colon, se observó una reducción del 90% en el tamaño del tumor transcurridos 23 días después del implante (Fig. 11A), mientras que la reducción en el caso de las células de pulmón fue del 65% (Fig. 11B). Esta reducción en los tamaños respectivos se
30 corroboró con una disminución semejante en las emisiones de fluorescencia de la proteína mCherry, presente en las células tumorales. Los análisis inmunohistoquímicos confirmaron el descenso en el número de vasos

sanguíneos y la ausencia de vasos linfáticos en los tumores tratados con B11, al igual que se había observado en el modelo de células de carcinoma pancreático.

- 5 Por tanto, se puede concluir que el anticuerpo B11, específico para la ephrin B2, tiene una potente capacidad antiangiogénica y antilinfoangiogénica, que se traduciría en una disminución o retardo en el crecimiento de aquellos tumores tratados con el anticuerpo. El anticuerpo 2B1 también presenta una buena capacidad antiangiogénica y antilinfoangiogénica.

10

Xenotransplantes

Se realizaron tres tipos de xenotransplantes: con células de carcinoma de páncreas (BxPC3), de colon (SW620, expresando de manera estable la proteína fluorescente mCherry (Clontech)) y de pulmón (H460, expresando de manera estable la proteína fluorescente mCherry). En los tres casos, se siguió básicamente el mismo protocolo. Se inyectaron subcutáneamente de 1 a 5 millones de células tumorales humanas en un volumen de 0,2 ml de PBS en el flanco de ratones inmunodeficientes (nude o SCID, del inglés “*Severe Combined Immunodeficiency*”) hasta observar macroscópicamente la presencia de una masa neoplásica (de unos 30 mm³). En este momento se inició el tratamiento mediante la administración intravenosa, a través de las venas de la cola, de los correspondientes anticuerpos en 100-200 µl de PBS en días alternos durante 2 semanas o hasta alcanzar la dosis final de 20 mg/kg. Los animales control recibieron PBS siguiendo las mismas pautas. Se midieron los tamaños de los tumores con un calibre 2-3 veces por semana y, en el caso de los ratones xenotransplantados con células marcadas con proteína fluorescente mCherry, además se midió la intensidad de emisión de fluorescencia (número de fotones por segundo y centímetro cuadrado) a 610 nm en un sistema de imagen IVIS Spectrum 200 (Caliper LifeSciences) para visualizar el crecimiento tumoral en función de la intensidad de emisión de la proteína mCherry. El procesamiento final de las imágenes incluye una sustracción de la señal

residual (eliminación de la autofluorescencia) y una coloración a escala siguiendo un perfil de intensidad de señal. Los animales se sacrificaron por asfixia con CO₂ cuando la neoplasia alcanzó un tamaño predeterminado de 1.500-2.000 mm³, de acuerdo con la Legislación vigente relativa al uso de animales de experimentación. El análisis estadístico de las medidas de crecimiento tumoral se realizó mediante análisis paramétrico utilizando la prueba t-Student. El nivel de significación estadística se situó en p≤0,05.

Análisis histológicos

10

Las muestras tumorales procedentes de los ratones xenotransplantados se extrajeron a partir de animales sacrificados un día después de la finalización del tratamiento con los anticuerpos. Dichas muestras se fijaron con formalina y se embebieron en parafina. Los cortes histológicos procedentes de cada tumor se tiñeron con hematoxilina y eosina o se prepararon para una caracterización inmunohistoquímica. La actividad proliferativa de las células tumorales se analizó mediante tinción con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 (DAKO), la presencia de células apoptóticas se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa 3 activa (R&D), la nueva vascularización se midió mediante tinción contra CD34 en células endoteliales con un anticuerpo monoclonal de rata específico (Abcam) y los vasos linfáticos se marcaron mediante tinción con un anticuerpo policlonal de conejo anti-LYVE1 (Abcam). La visualización de todos los cortes se llevó a cabo con tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina *plus* (DAKO) y se contratiñeron con hematoxilina. Las células positivas se contaron mediante el sistema AxioVision (Zeiss).

25

EJEMPLO 5: Biodistribución y localización de masas tumorales *in vivo*.

Con el objeto de analizar la distribución del anticuerpo dentro de los animales y comprobar que se localizaba en las zonas de desarrollo tumoral, se diseñó un experimento en el cual ratones xenotransplantados con una línea tumoral, en este caso H460 de carcinoma de pulmón, fueron tratados con el anticuerpo

30

5 marcado con un fluorocromo AlexaFluor®750 (Molecular Probes) cuya emisión está cercana al infrarrojo. Para confirmar la posición de la masa tumoral se utilizaron células que expresan la proteína fluorescente mCherry. En ratones atímicos desnudos nu/nu se implantaron por vía subcutánea en la región dorsal
10 células H460. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 0,3 cm³, se administraron por vía intravenosa 15 µg del anticuerpo conjugado con AlexaFluor®750. A las 0,5, 2, 6, 24 y 48 horas después de la administración, se tomaron imágenes de las regiones ventral y dorsal. El estudio de las imágenes dorsales de los ratones sirvió para localizar los anticuerpos en la masa tumoral desde la media hora de su administración (Figura 12A) con un nivel máximo a las 6 horas (Figura 12B). La intensidad de fluorescencia en el tumor emitida por el anticuerpo B11 a las 6 horas fue claramente superior a la mostrada por el anticuerpo 2B1, indicando que B11 localiza más eficientemente en la zona tumoral que 2B1. A la media hora la señal en la zona vesical y en los riñones
15 fue muy intensa, indicando una rápida y activa eliminación de los anticuerpos por vía renal. A las 48 horas, la señal en estas zonas era muy débil, con valores cercanos a la autofluorescencia, sugiriendo que la práctica totalidad de los anticuerpos habían sido completamente eliminados. Además, los animales mostraron una señal de fluorescencia durante las primeras horas en la región
20 ventral superior, atribuible a un cierto grado de eliminación de los anticuerpos por vía hepatobiliar, este hecho se demostró cuando se analizaron los órganos por separado y se comprobó que el hígado a las 6 horas presentaba una fluorescencia de alrededor de 1×10^8 p/s/cm²/sr (fotones/segundo/centímetro cuadrado/steradian).

25

Biodistribución

Para el experimento de la distribución de los scFv se utilizaron ratones nude xenotransplantados con la línea de carcinoma de pulmón H460 expresando de
30 manera estable la proteína fluorescente mCherry. La utilización de células con marcadores fluorescentes se realizó para situar inequívocamente el tumor. Se inyectaron 5×10^6 células por vía subcutánea y se dejaron crecer hasta que la

masa neoplásica alcanzó un tamaño en torno a 500 mm³. Paralelamente, los scFv se conjugaron al fluorocromo AlexaFluor®750 mediante el SAIVI™ Rapid Antibody Labeling Kit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño esperado, a cada ratón se
5 inyectaron vía intravenosa 15 µg de anticuerpo marcado. Las imágenes de fluorescencia *in vivo* se tomaron a las 0,5, 2, 6, 24 y 48 horas después de la administración del scFv marcado con un sistema de imagen *in vivo* IVIS Spectrum 200 (Caliper LifeSciences) excitando el fluorocromo a 749 nm. Tras eliminar la autofluorescencia, se procedió a dar una coloración a escala
10 siguiendo un perfil de intensidad de señal.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado caracterizado porque:
 - (a) comprende una secuencia aminoacídica de al menos un 76% de
5 identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y
 - (b) reconoce y se une específicamente a la ephrin B2.

2. El polipéptido según la reivindicación anterior donde la secuencia
10 aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

3. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde
dicho polipéptido es un anticuerpo.

4. El polipéptido según la reivindicación anterior donde dicho anticuerpo es
15 humano.

5. El polipéptido según la reivindicación anterior donde el isotipo del
anticuerpo humano es IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgA.

- 20 6. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
caracterizado porque además comprende un péptido señal.

7. El polipéptido según la reivindicación anterior donde el péptido señal es
SEQ ID NO: 6.
25

8. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
caracterizado porque además comprende al menos un marcador.

9. El polipéptido según la reivindicación anterior donde el marcador se
30 selecciona de la lista que comprende: c-myc, FLAG, HA, cadena de
histidinas, GST, biotina, VSV-G, HSVtk, V5, biotina, avidina,
estreptavidina, proteína de unión a maltosa y una proteína fluorescente.

10. El polipéptido según la reivindicación anterior donde el marcador es una cadena de histidinas, c-myc o ambos.
- 5 11. El polipéptido según la reivindicación anterior donde la secuencia aminoacídica de dicho polipéptido es SEQ ID NO: 7.
12. Un anticuerpo contra ephrin B2 cuya secuencia aminoacídica comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 10 13. Un ácido nucleico que codifica para el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o para el anticuerpo según la reivindicación 12.
- 15 14. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación anterior.
15. El vector según la reivindicación anterior donde el vector es un vector de expresión.
- 20 16. Una célula que comprende el vector según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15.
17. La célula según la reivindicación anterior donde dicha célula es procarionta.
- 25 18. La célula según la reivindicación 16 donde dicha célula es eucariota.
19. La célula según la reivindicación anterior donde dicha célula es una célula de mamífero.
- 30 20. Un método de obtención del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o del anticuerpo según la reivindicación 12, que

comprende las etapas (a) expresar el vector descrito según la reivindicación 15 en una célula y (b) purificar el polipéptido expresado en la etapa (a).

5 21. El método según la reivindicación anterior donde la célula es procariota.

22. El método según la reivindicación 20 donde la célula es eucariota.

10 23. Un método de detección y/o cuantificación de la ephrin B2 que comprende las etapas (a) poner en contacto una muestra biológica aislada con el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o con el anticuerpo según la reivindicación 12 y (b) detectar y/o cuantificar el complejo formado por la ephrin B2 y dicho polipéptido o dicho anticuerpo, en la muestra empleada en (a).

15

24. Un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a la expresión de la ephrin B2 que comprende las etapas (a) poner en contacto una muestra biológica aislada con el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o con el anticuerpo según la reivindicación 12, (b) detectar y/o cuantificar el complejo formado por la ephrin B2 y dicho polipéptido o dicho anticuerpo en la muestra empleada en (a), (c) comparar los niveles de ephrin B2 detectados con los niveles control y (d) asociar el resultado de dicha comparación a la presencia o ausencia de la enfermedad.

20

25. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o del anticuerpo según la reivindicación 12, para preparar un medicamento.

26. Uso según la reivindicación anterior para inhibir la angiogénesis.

25

27. Uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una condición patológica

asociada a la angiogénesis.

28. Uso según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un tumor o del cáncer.

5

29. Uso según la reivindicación anterior donde el tumor o el cáncer es sólido.

30. Uso según la reivindicación anterior donde el cáncer es de páncreas, colon o pulmón.

10

31. Una composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el anticuerpo según la reivindicación 12, el ácido nucleico según la reivindicación 13, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 o la célula según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

15

32. La composición según la reivindicación anterior, donde dicha composición es una composición farmacéutica.

20

33. La composición según la reivindicación anterior caracterizada porque además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

34. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32 caracterizada porque además comprende un agente antiangiogénico.

25

35. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32 caracterizada porque además comprende un agente quimioterapéutico.

30

36. Uso de la composición según cualquiera de las cinco reivindicaciones anteriores para preparar un medicamento.

37. Uso según la reivindicación anterior para inhibir la angiogénesis.

38. Uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una condición patológica asociada a la angiogénesis.
- 5 39. Uso según la reivindicación anterior para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un tumor o del cáncer.
40. Uso según la reivindicación anterior donde el tumor o el cáncer es sólido.
- 10 41. Uso según la reivindicación anterior donde el cáncer es de páncreas, colon o pulmón.

FIG. 1

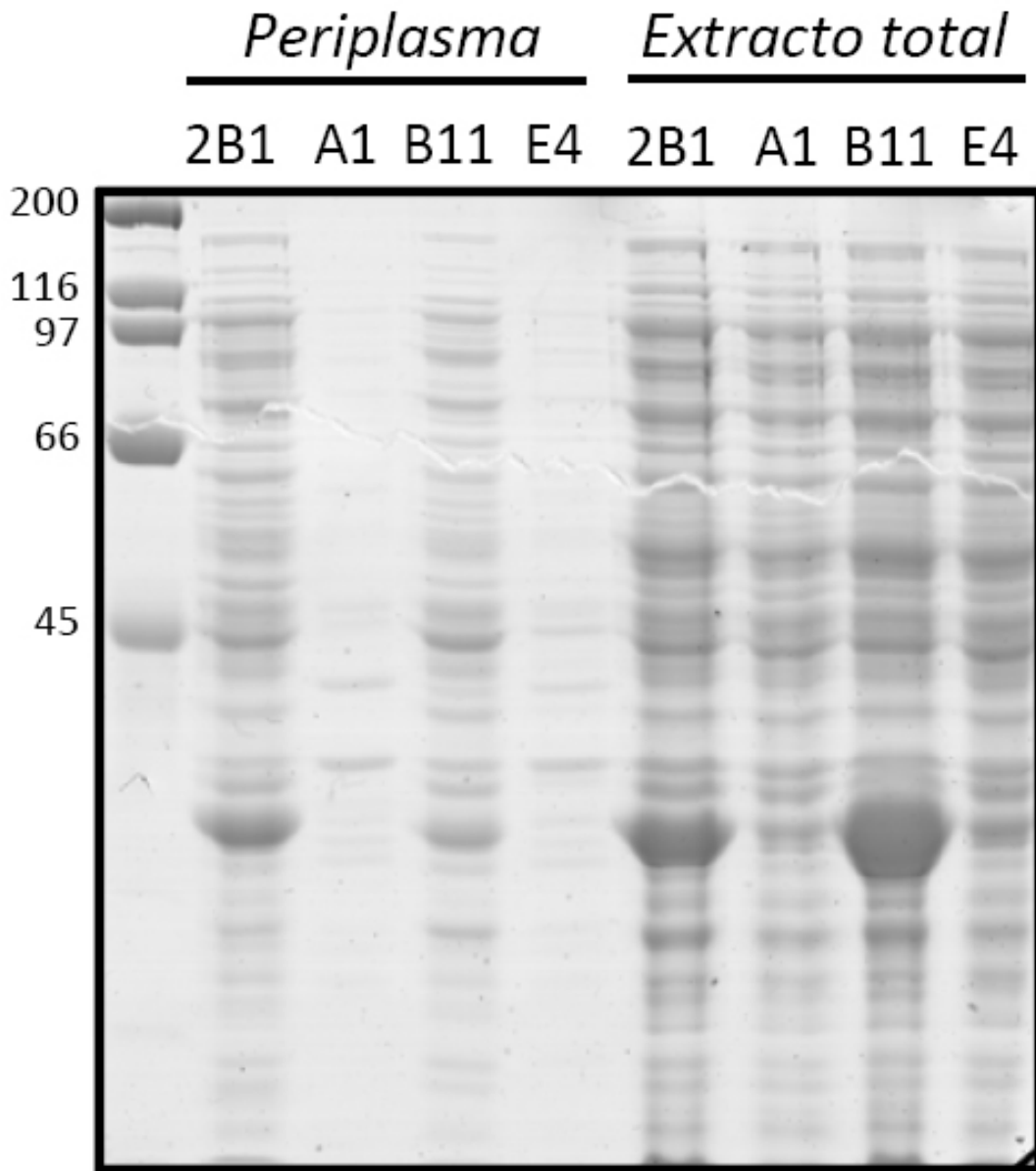


FIG. 2

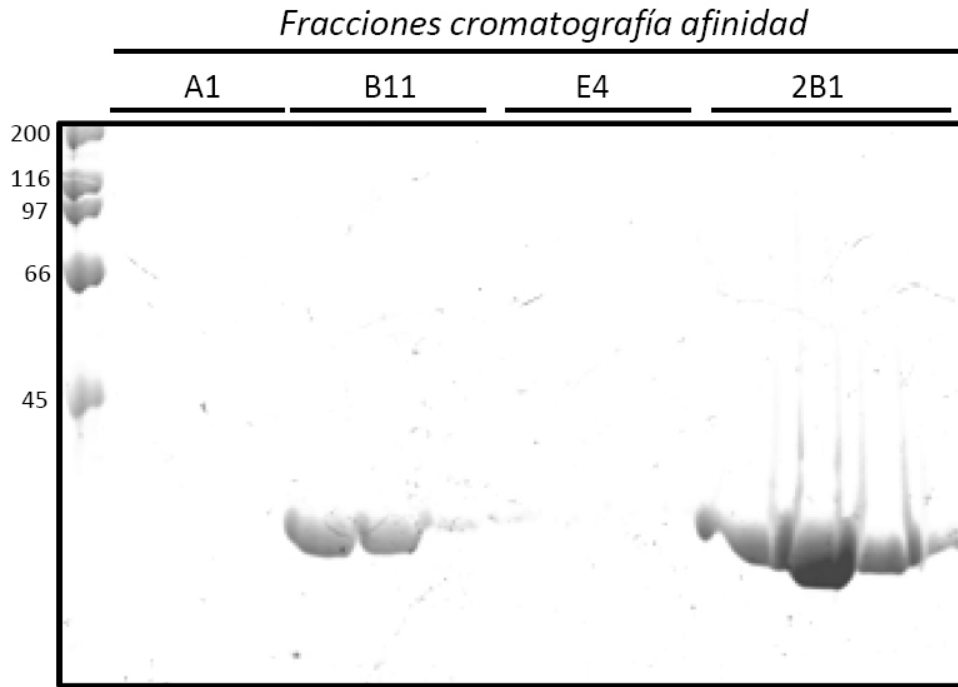


FIG. 3

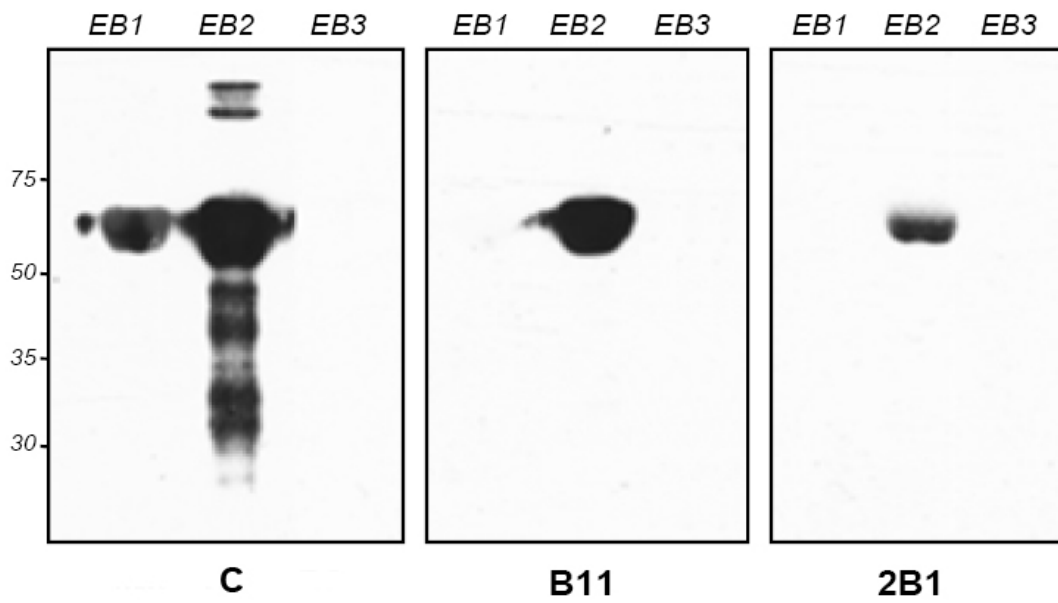
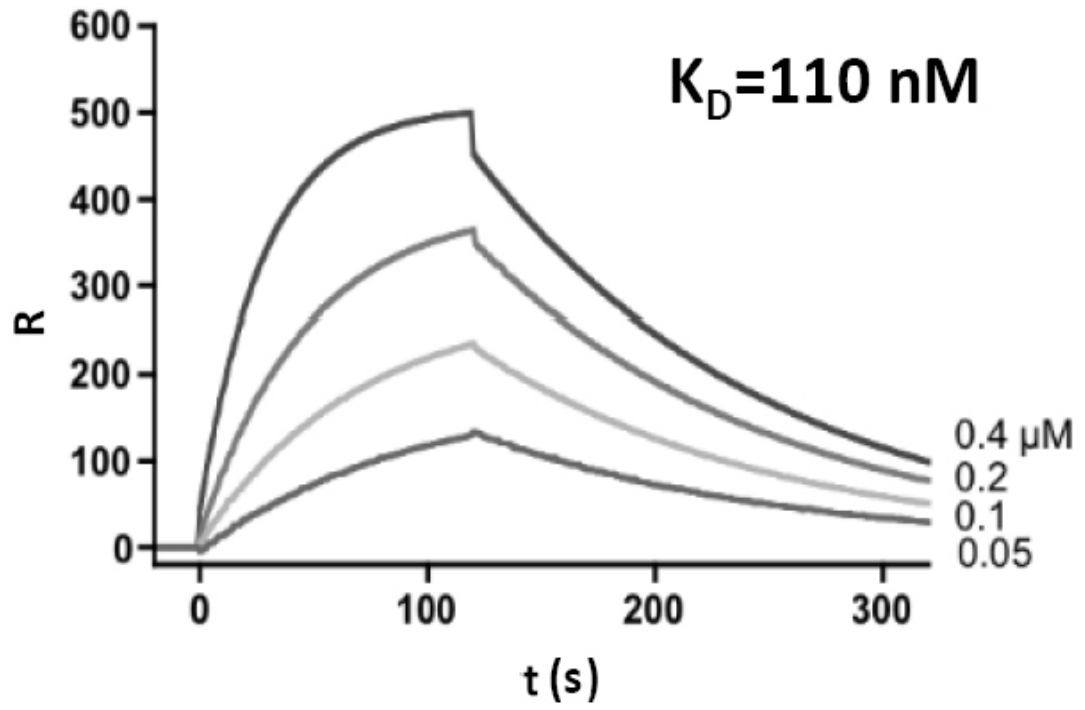


FIG. 4

A



B

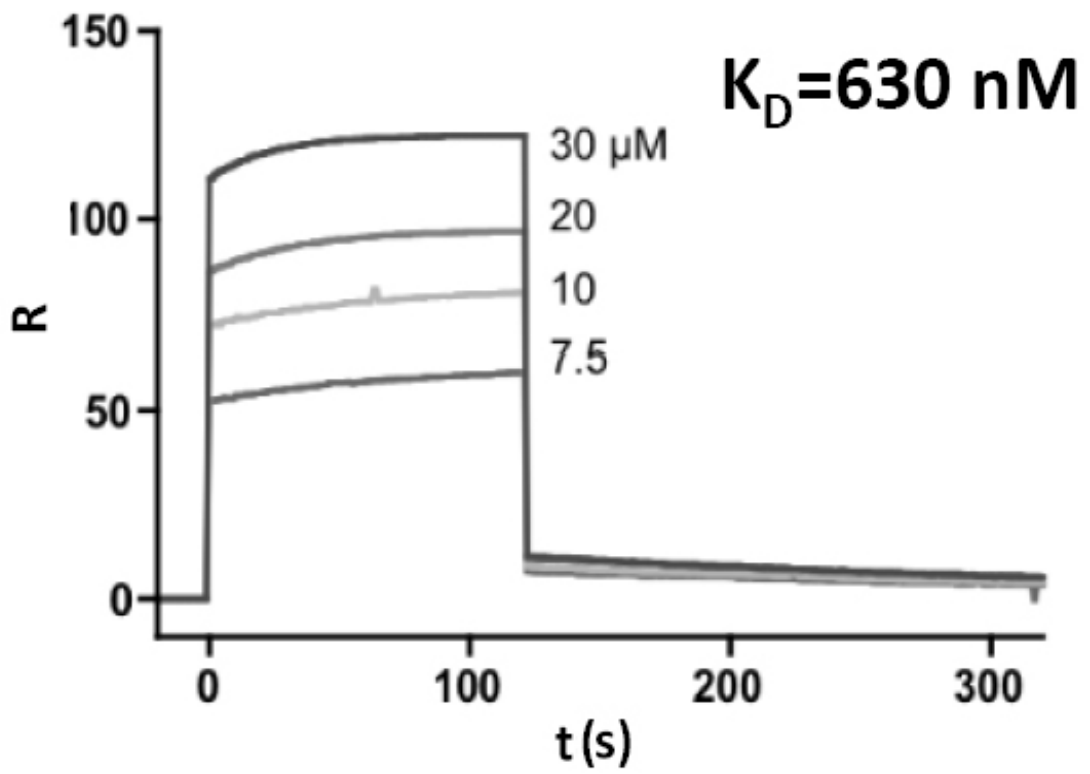
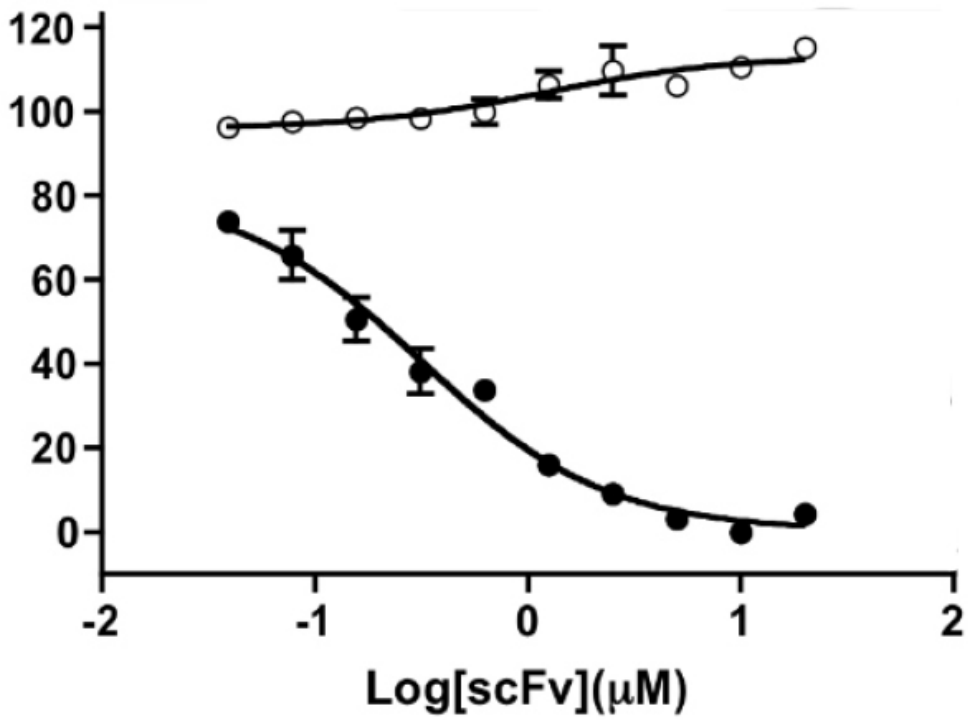


FIG. 5

A



B

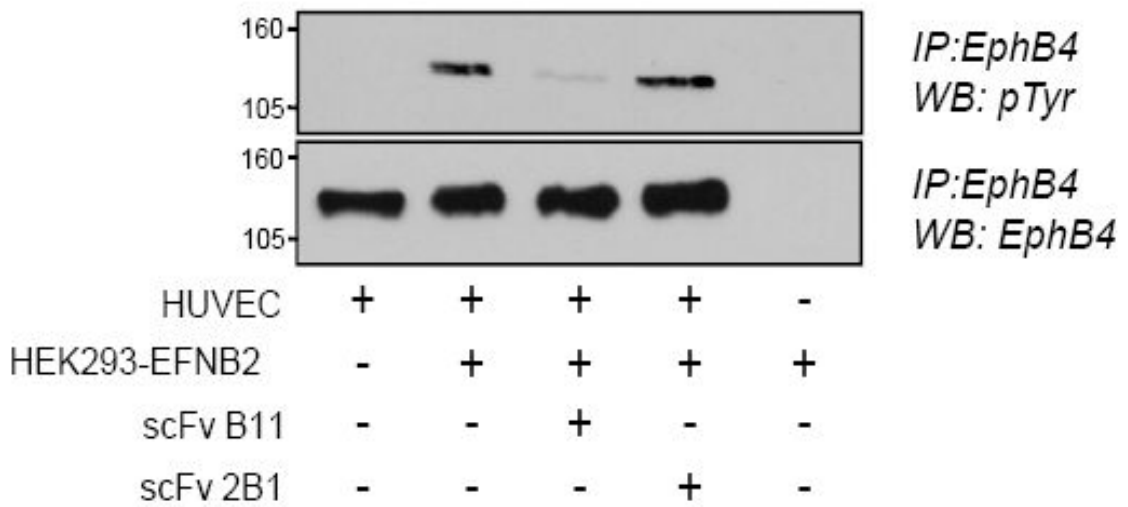


FIG. 6

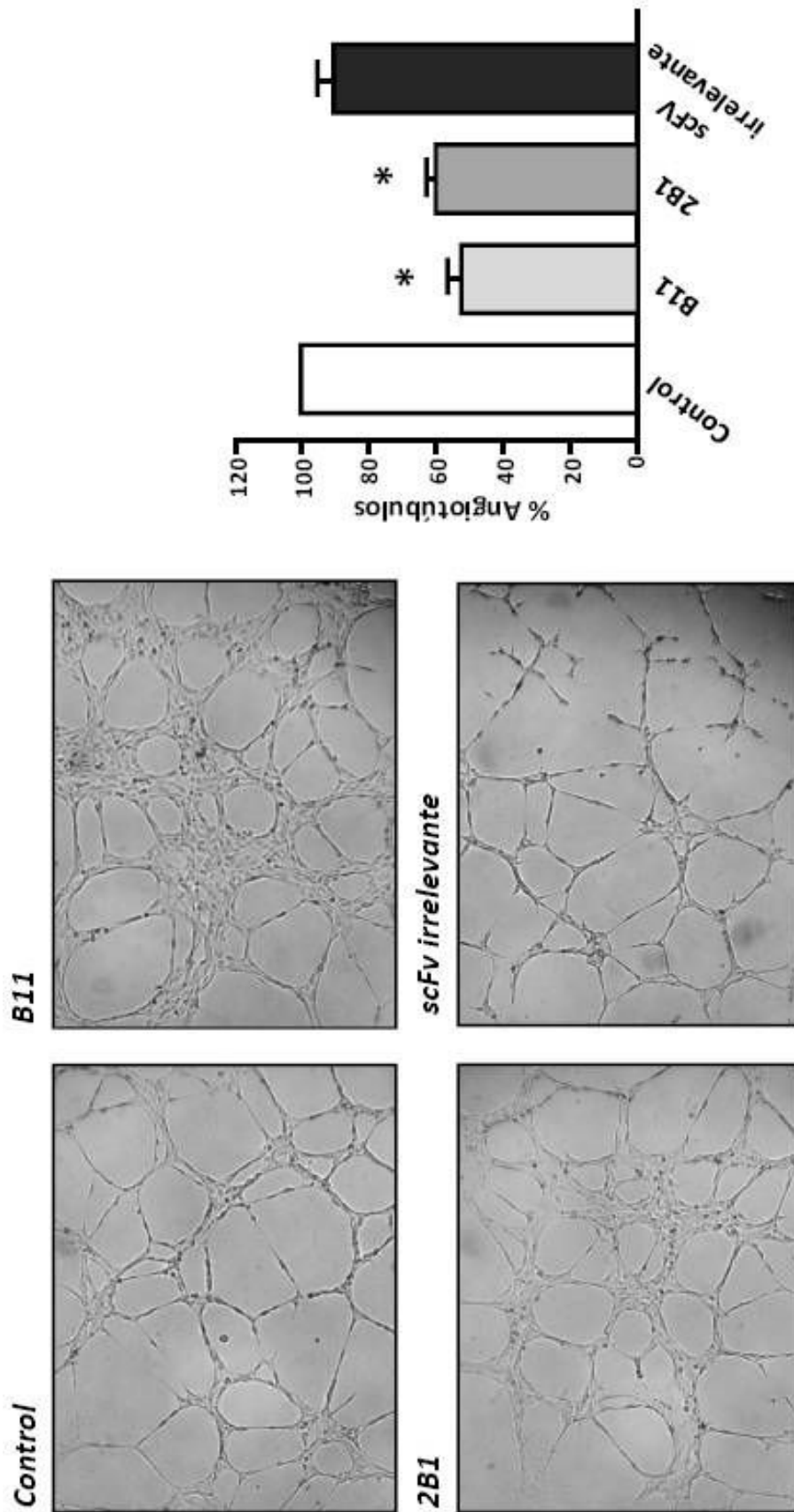


FIG. 7

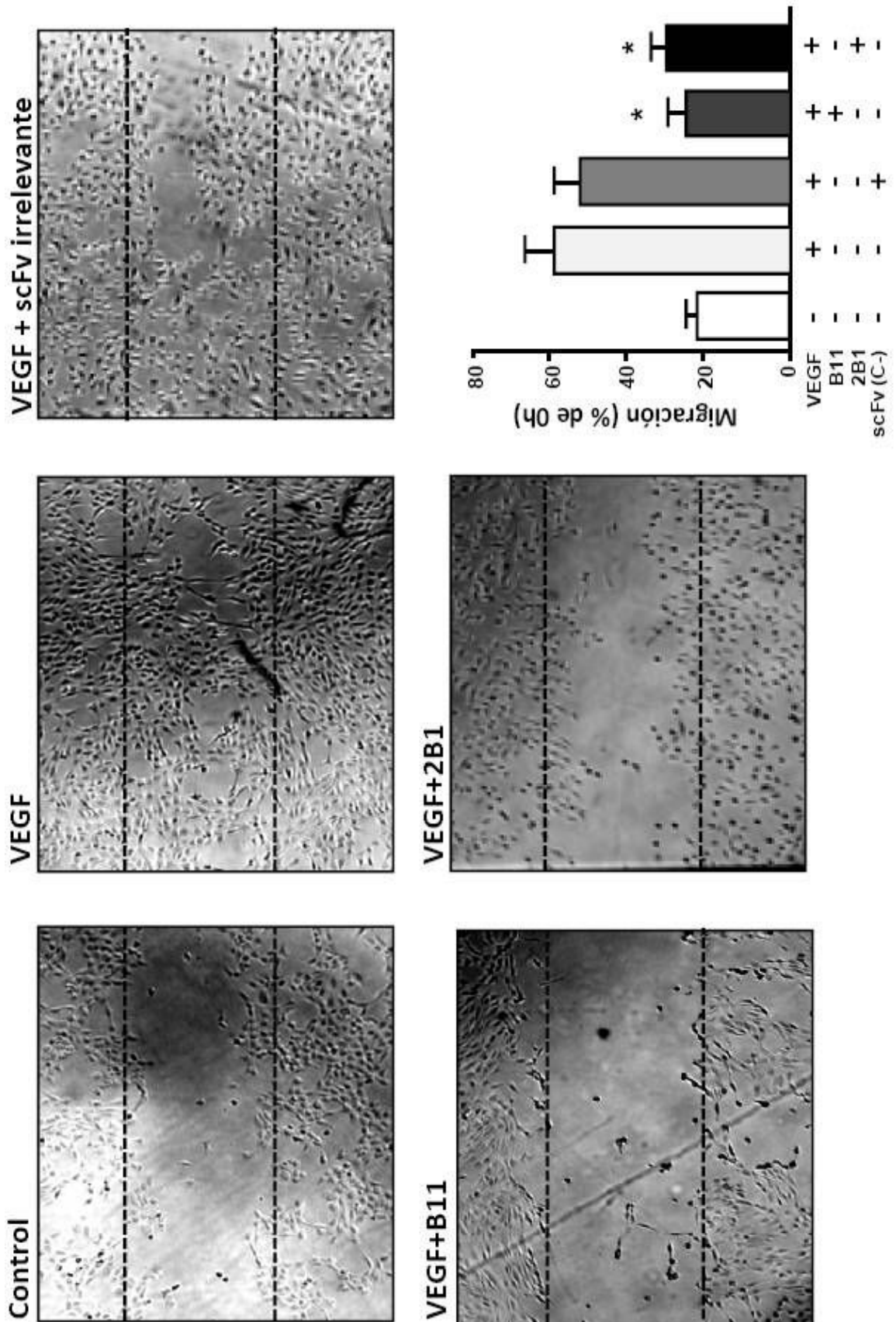
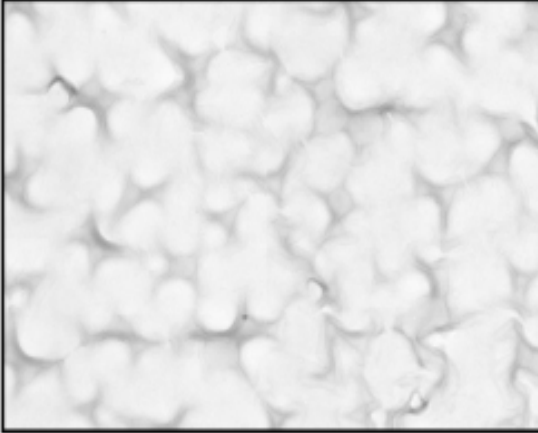
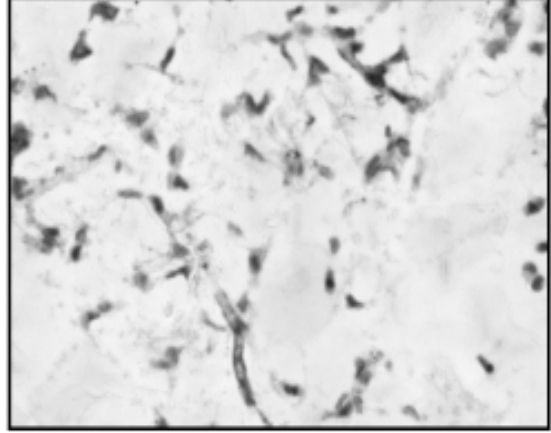


FIG. 8A

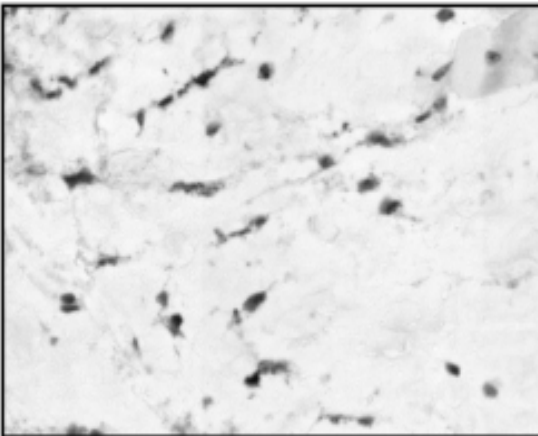
Control



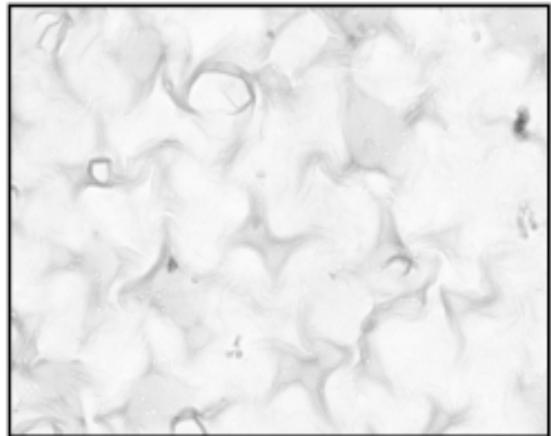
VEGF



VEGF + scFv irrelevante



VEGF+B11



VEGF+2B1

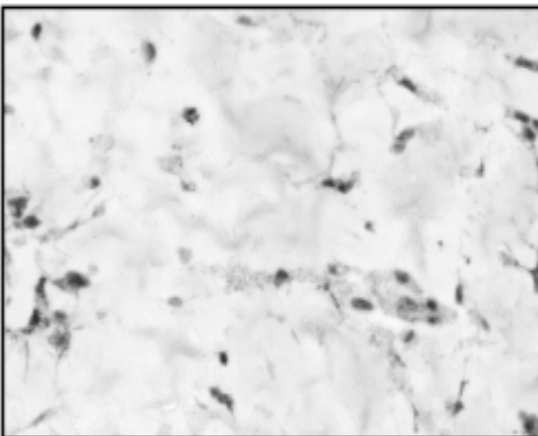


FIG. 8B

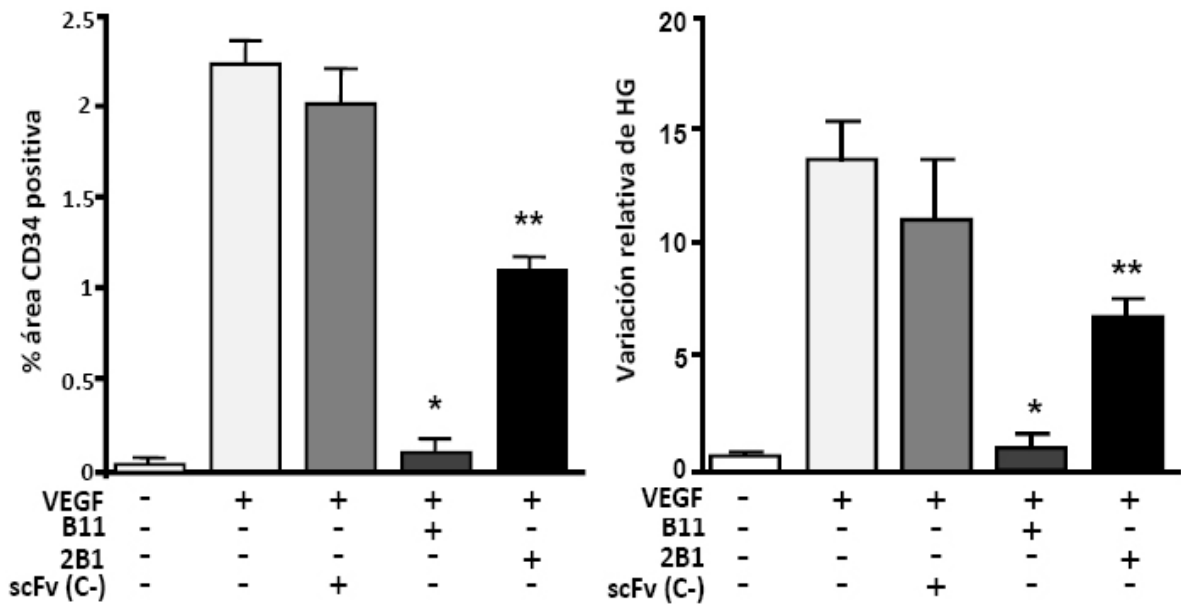


FIG. 9

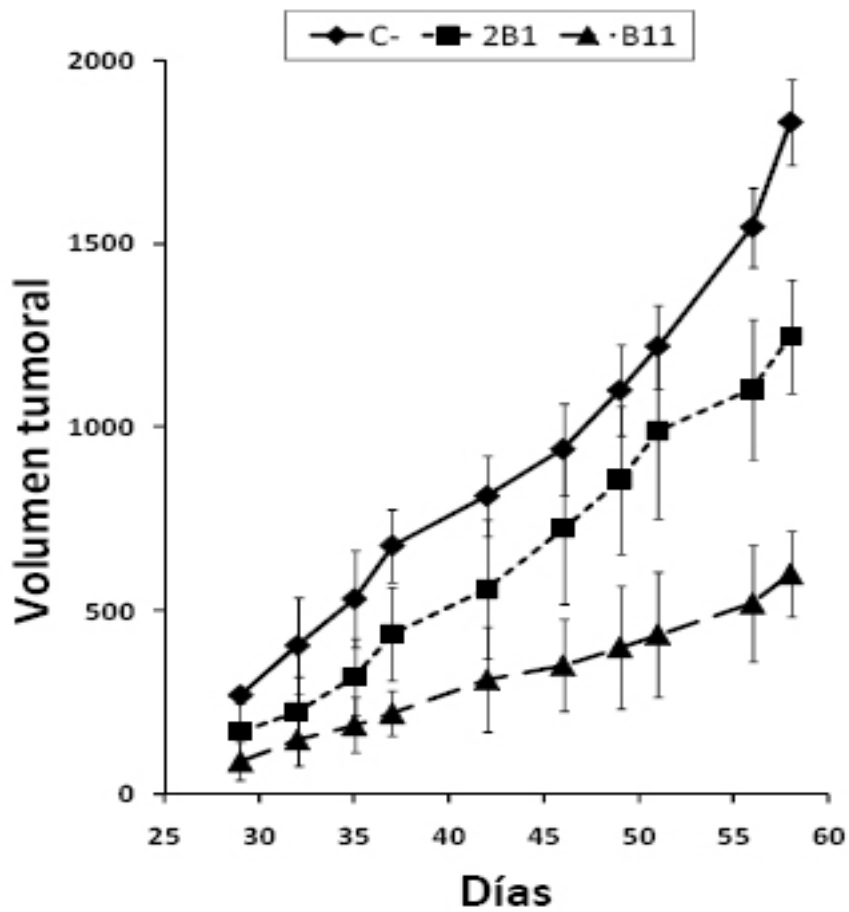


FIG. 10

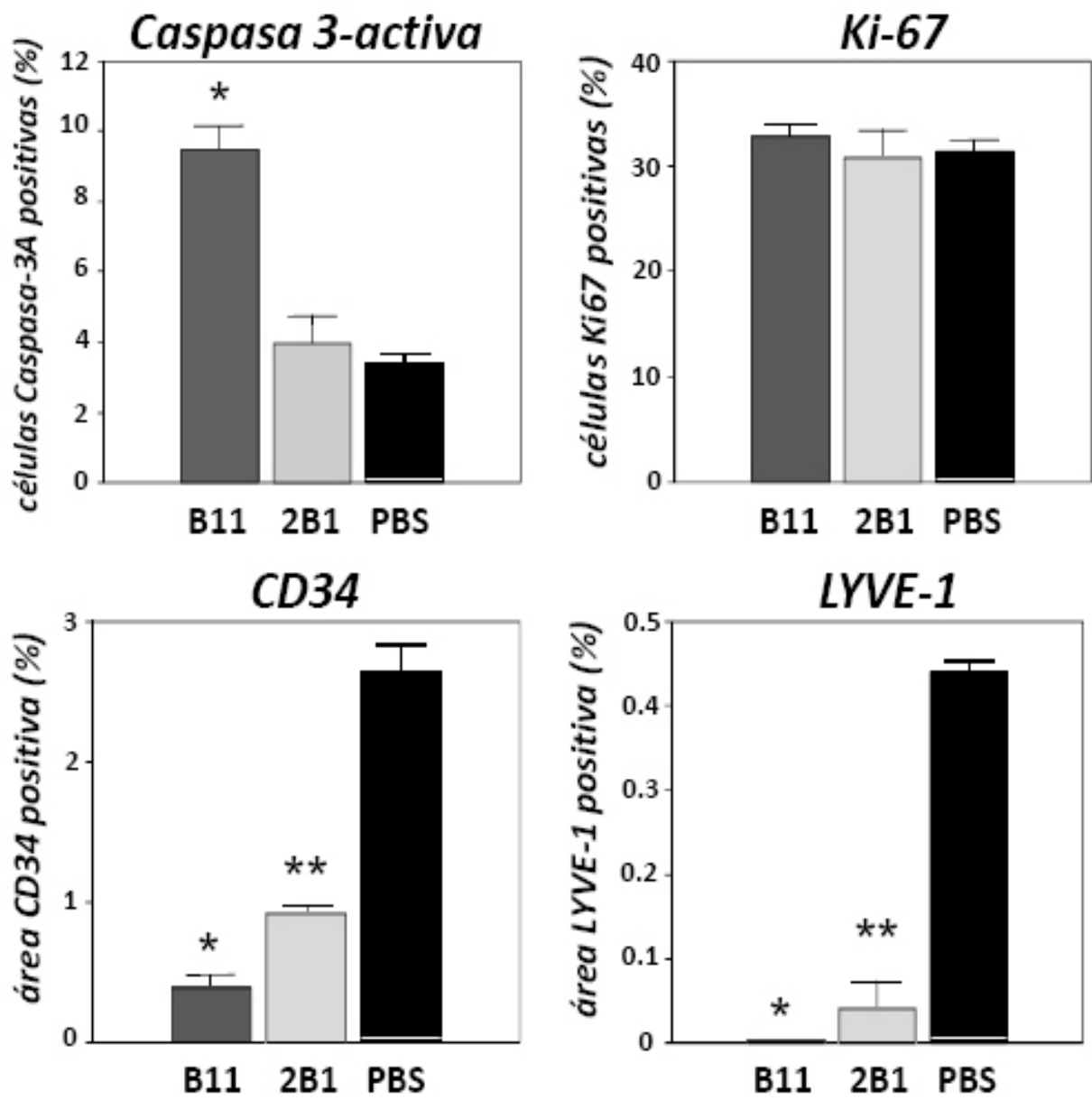


FIG. 11A

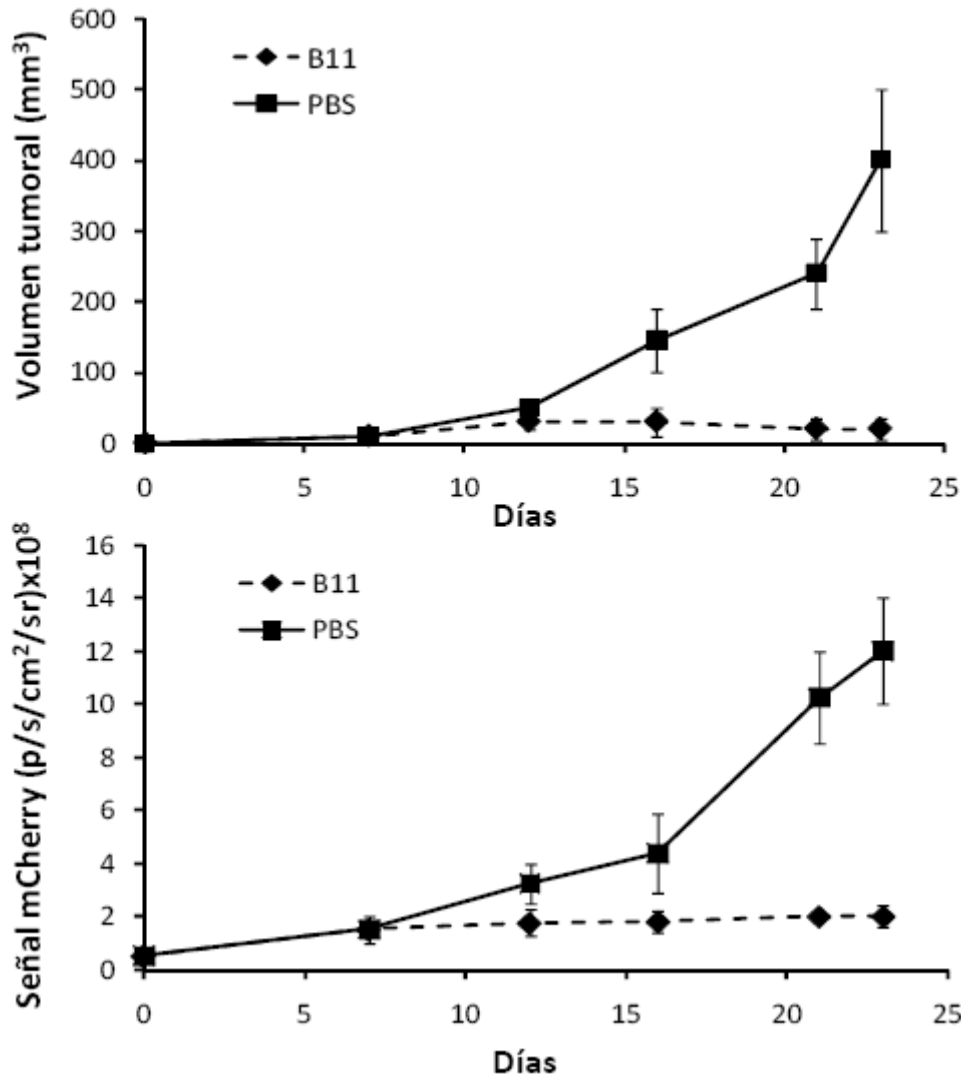


FIG. 11B

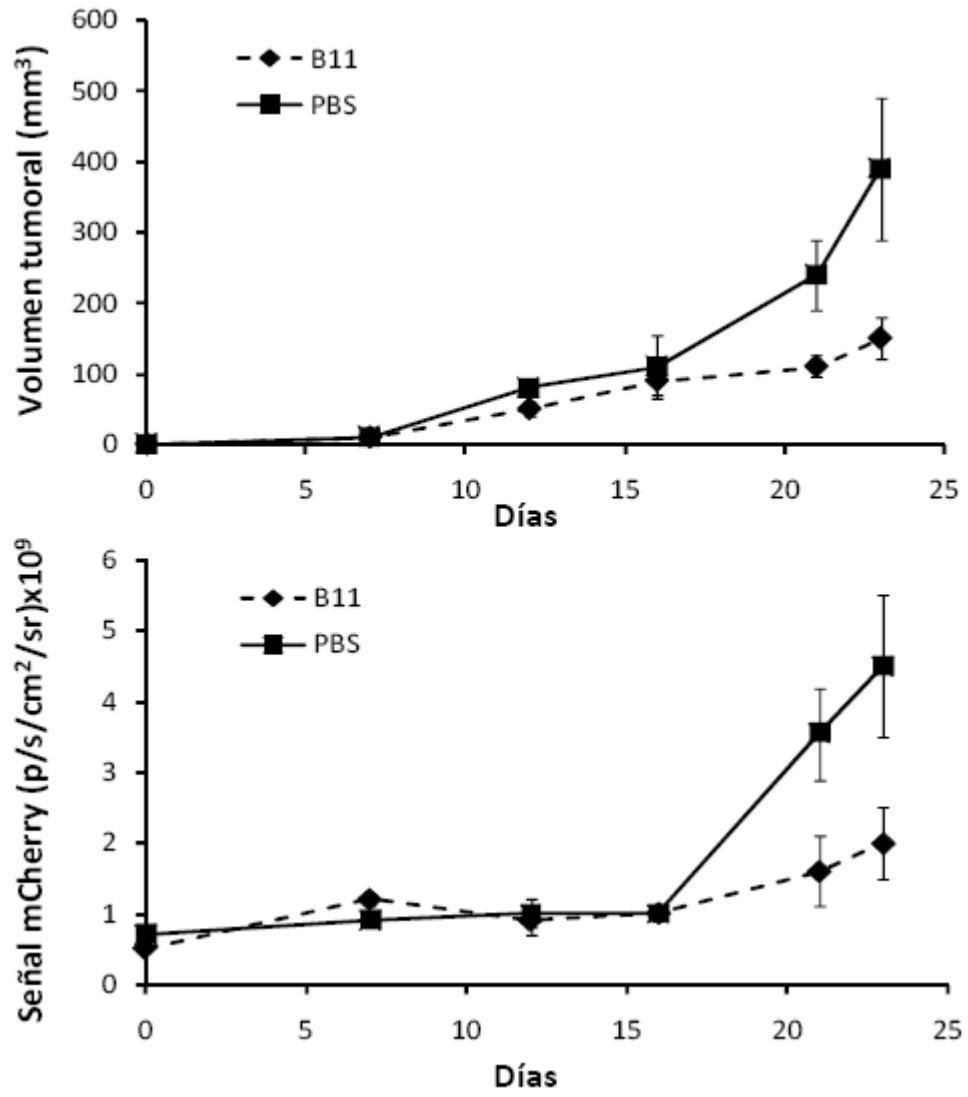


FIG. 12A

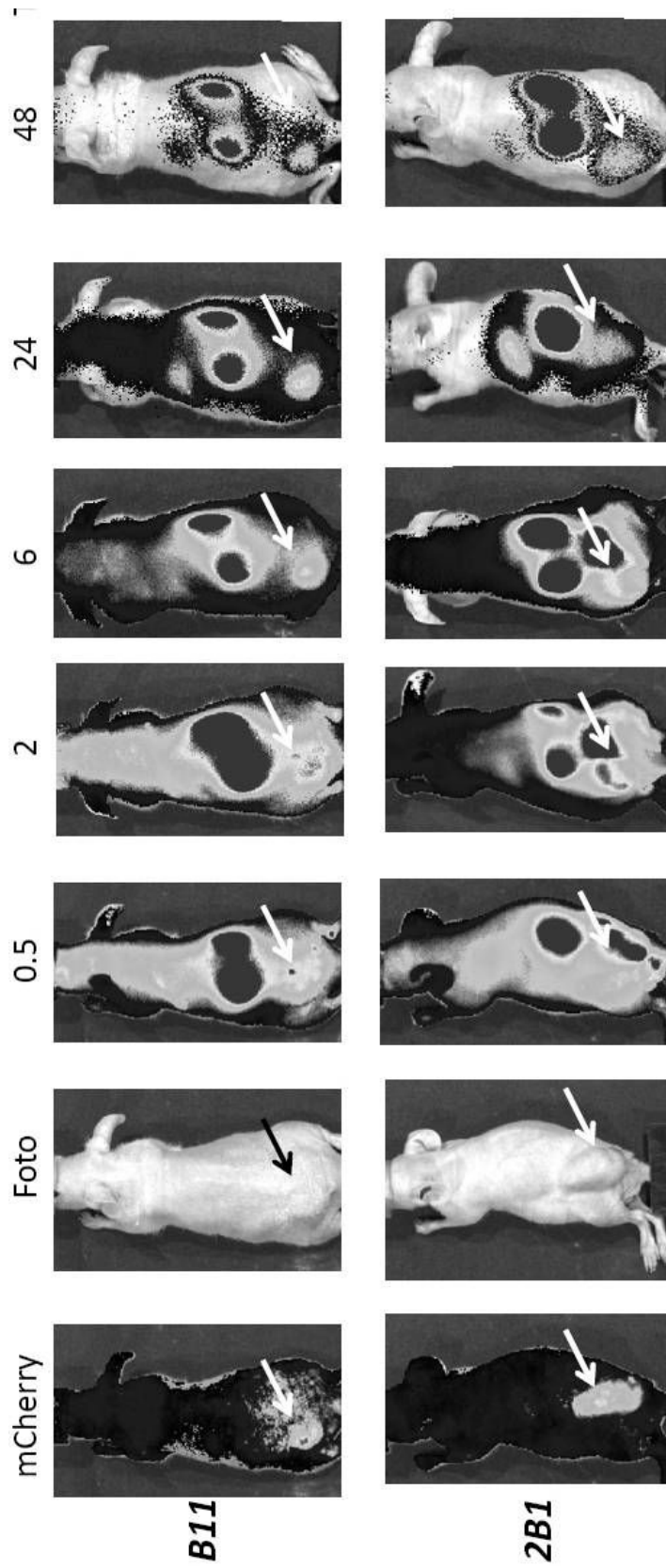
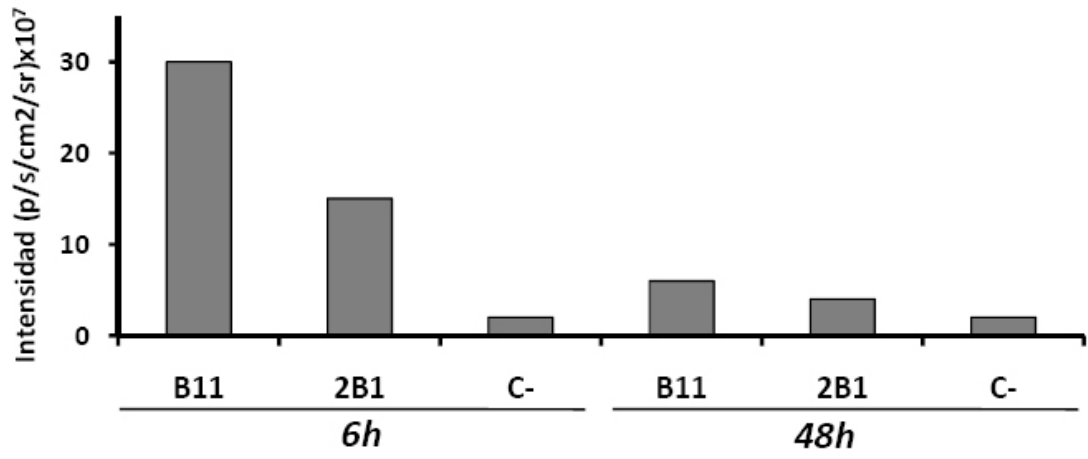


FIG. 12B



ES 2 378 976 B1

1599 10_ST25
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

<120> Anticuerpo contra ephrin B2 y su uso

<130> ES1599.10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln
50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Thr Gly Thr Ala Thr Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
145 150 155 160

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
165 170 175

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu
180 185 190

Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1

ES 2 378 976 B1

195 200 1599 10_ST25 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 210 215 220

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Leu Leu Ser Pro Val Thr Phe
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Thr
 245 250 255

<210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sentido para la comprobación de la secuencia de los scFv

<400> 2
 cataatgaaa tacctattgc cta 23

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador antisentido para la comprobación de la secuencia de los scFv.

<400> 3
 cttattagcg ttgccatt 19

<210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sentido con la diana de RcaI.

<400> 4
 cagtcacat gaaataccta ttgcctac 28

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador antisentido con la diana de XhoI.

<400> 5
 caccggactc gagtgcggcc ccattcag 28

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Erwinia carotovora

ES 2 378 976 B1

1599 10_ST25

<400> 6

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala
20

<210> 7

<211> 301

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> scFv del clon B11 que incluye el péptido señal y los marcadores c-myc y cadena de histidinas.

<400> 7

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Asn Thr
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr
85 90 95

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Thr Gly Thr Ala Thr Gly
115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val
145 150 155 160

Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala
165 170 175

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr
180 185 190

ES 2 378 976 B1

1599 10_ST25

Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
195 200 205

Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
225 230 235 240

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Leu Leu Ser
245 250 255

Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val
260 265 270

Ala Ala Pro Thr Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
275 280 285

Leu Asn Gly Ala Ala Leu Glu His His His His His His
290 295 300

<210> 8
<211> 291
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> scFv del clon 2B1.

<400> 8

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

ES 2 378 976 B1

1599 10_ST25

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly His Arg Thr Ser Asp Ala Phe
 115 120 125

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu
 145 150 155 160

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

Thr Cys Gly Gly Asp Ser Ile Gly Leu Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
 180 185 190

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Ser Ser Asp Ser Asp
 195 200 205

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
 210 215 220

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Met Val Phe Gly
 245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
 260 265 270

Ala Ala Ala Leu Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His
 275 280 285

His His His
 290



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031402

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K16/28** (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007053718 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV) 10.05.2007, página 95, SEQ ID NO: 39.	1-41
A	EP 1972637 A1 (UNIV STUTTGART) 24.09.2008, SEQ ID NO: 9.	1-41
A	WO 2010019565 A2 (MEDLMMUNE LLC) 18.02.2010, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-41
A	WO 2007127506 A2 (GENENTECH INC) 08.11.2007, todo el documento. Citado en la solicitud	1-41
A	WO 2006022295 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 02.03.2006, todo el documento.	1-41

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.03.2012

Examinador
M. Hernández Cuellar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, EBI SECQUENCES DATABASES, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE , EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-41	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-41	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007053718 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV)	10.05.2007
D02	EP 1972637 A1 (UNIV STUTTGART)	24.09.2008
D03	WO 2010019565 A2 (MEDLMMUNE LLC)	18.02.2010
D04	WO 2007127506 A2 (GENENTECH INC)	08.11.2007
D05	WO 2006022295 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK)	02.03.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos específicos contra ephrin B2 que tienen actividad antiangiogénica y antilinfoangiogénica, y son capaces de inhibir el crecimiento de tumores sólidos. Concretamente el anticuerpo B11 que se describe la solicitud reconoce específicamente la ephrin B2 de manera que inhibe su unión al receptor Eph B4. La invención también reivindica su uso para detectar la proteína ephrin B2 y como medicamento para inhibir la angiogénesis y la linfoangiogénesis, en el tratamiento de enfermedades en las que estos procesos están implicados como, por ejemplo, el cáncer.

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

El anticuerpo descrito en la invención consiste según la reivindicación 1 en un polipéptido aislado caracterizado porque:

(a) comprende una secuencia aminoacídica de al menos un 76% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y

(b) reconoce y se une específicamente a la ephrin B2.

Según la reivindicación 2 este polipéptido está caracterizado por la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. A esta secuencia se añade un péptido señal y un marcador dando como resultado la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 de la reivindicación 11.

En el estado de la técnica no se ha localizado ninguna secuencia que presente un 100% de identidad con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 7.

Los documentos disponibles en el estado de la técnica que se consideran más cercanos a las secuencias reivindicadas en la invención son D01 y D02. En el documento D01 se describe una secuencia identificada como SEQ ID NO : 39 que presenta un 80.8% de identidad con SEQ ID NO: 1 en un solapamiento de 250 aa (1-250:1-243). No obstante el documento D01 se refiere a un anticuerpo humano antiGPNMB por lo que no se puede considerar relevante en cuanto a la actividad inventiva de la reivindicación 1.

Por su parte el documento D02 describe un anticuerpo humanizado específico del receptor 1 del factor de necrosis tumoral humano (huTNFR1). La secuencia SEQ ID NO: 9 presenta un 78.8% de identidad con SEQ ID NO: 7 en un solapamiento de 302 aa (1-301:1-288).

En el estado de la técnica relativo a la invención existen además otros documentos, como D03-D05, que describen anticuerpos específicos contra ephrin B2, pero cuyas secuencias no presentan identidades relevantes con las secuencias reivindicadas en la presente solicitud.

En opinión de esta Oficina, a la luz del estado de la técnica comentado anteriormente, las reivindicaciones 1-41 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Art. 6.1 Y 8.1 LP