

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 783**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2016 PCT/US2016/026352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16164528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2016 E 16716795 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3280734**

54 Título: **Anticuerpos anti-Flt-1 para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

**07.04.2015 US 201562144251 P**  
**14.03.2016 US 201662307645 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.05.2022**

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**  
**(100.0%)**  
**1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku**  
**Osaka-shi, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

**KEEFE, DENNIS;**  
**DE HAARD, HANS;**  
**GABRIELS, SOFIE y**  
**DE JONGE, NATALIE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 910 783 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-Flt-1 para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne

## 5 ANTECEDENTES

[0001] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que afecta aproximadamente a 1:3600 nacimientos de varones con aproximadamente 50.000 individuos afectados en todo el mundo. El trastorno se caracteriza por un desgaste progresivo de los músculos y los niños afectados dependen de una silla de ruedas cuando alcanzan los 13 años de edad. Los individuos afectados por lo general presentan síntomas a los 3 años de edad, con una mediana de supervivencia entre los 25 y los 30 años. La insuficiencia respiratoria debida a debilidad diafragmática y la miocardiopatía son causas comunes de muerte.

[0002] La DMD está provocada por una mutación en el gen de la distrofina. El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X y codifica la proteína distrofina. La proteína distrofina es responsable de conectar la maquinaria contráctil (complejo de actinmiosina) de una fibra muscular a la matriz extracelular circundante a través del complejo distroglicano. Las mutaciones en el gen de la distrofina dan como resultado la alteración o la ausencia de la proteína distrofina y la función anormal de la membrana sarcolémica. Si bien tanto los hombres como las mujeres pueden portar una mutación en el gen de la distrofina, las mujeres rara vez se ven afectadas por la DMD.

[0003] Una característica de la DMD es la isquemia de los tejidos afectados. La isquemia es una restricción o disminución en el suministro de sangre a los tejidos u órganos, lo que provoca una escasez de oxígeno y nutrientes necesarios para el metabolismo celular. La isquemia generalmente es causada por la constricción u obstrucción de los vasos sanguíneos que da como resultado daño o disfunción del tejido u órgano. El tratamiento de la isquemia está dirigido a aumentar el flujo de sangre al tejido u órgano afectado.

[0004] Actualmente, no existe una cura para la DMD. Se han investigado varias vías terapéuticas, incluida la terapia génica y la administración de corticosteroides; sin embargo, todavía existe la necesidad de alternativas para los pacientes con DMD. El documento WO 2014/117160 analiza los anticuerpos anti-Flt-1 y el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne utilizando los mismos.

## RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] Como se describe en los ejemplos a continuación, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los anticuerpos anti-Flt-1, o sus fragmentos de unión a antígeno, pueden inhibir la unión de VEGF y otros ligandos al receptor Flt-1, aumentando así la cantidad de VEGF y/u otros ligandos disponibles para unirse a los receptores de VEGF. La mayor disponibilidad de VEGF promueve la angiogénesis con un mayor flujo sanguíneo al músculo para combatir la isquemia funcional y conducir a mejoras en las características estructurales y funcionales de la DMD. De hecho, como se muestra en los presentes Ejemplos, los presentes inventores han demostrado que la administración del anticuerpo anti-Flt-1 mejora las medidas de la patología muscular (p. ej., angiogénesis mejorada, fibrosis reducida, necrosis reducida). Por lo tanto, la presente invención proporciona agentes terapéuticos seguros y eficaces basados en anticuerpos para el tratamiento de la DMD.

[0006] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: (a) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y una cadena pesada región de cadena variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (c) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (d) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; o (e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

[0007] En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO:87 a SEQ ID NO:89.

[0008] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:76 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 71; (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 85 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID NO:72; (c) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 84 y una cadena pesada que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 71; (d) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 86 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 73; o (e) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 83 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 70. En una forma de realización particular, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

**[0009]** En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en IgG, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFvs, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es IgG. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es IgG1. En otra forma de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado. En otra forma de realización más, el anticuerpo monoclonal humanizado contiene una región Fc humana. En algunas formas de realización, la región Fc contiene una o más mutaciones que mejoran la afinidad de unión entre la región Fc y el receptor FcRn de manera que se prolonga la semivida in vivo del anticuerpo. En otra forma de realización, la región Fc contiene una o más mutaciones en posiciones correspondientes a Leu 234, Leu 235 y/o Gly 237 de IgG1 humana.

**[0010]** En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a VEGF R2 y/o VEGF R3. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a un Flt-1 de ratón o mono.

**[0011]** En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-Flt-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0012]** En otro aspecto más, la invención proporciona una célula de hibridoma que produce el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

**[0013]** En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección mediada por Flt-1, en la que la enfermedad mediada por Flt-1, trastorno o condición es distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, preeclampsia, enfermedad renal crónica o fibrosis tisular.

**[0014]** En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, el tratamiento comprende además administrar al sujeto uno o más agentes terapéuticos adicionales que pueden seleccionarse del grupo que consiste en prednisona, deflazacort, folistatina, agentes terapéuticos moduladores de ARN, terapéutica de omisión de exón y terapia génica.

**[0015]** En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por vía parenteral. En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, la administración parenteral se selecciona de la administración intravenosa, intradérmica, intratecal, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea y/o transmucosa. En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, la administración parenteral es una administración intravenosa. En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, la administración parenteral es la administración subcutánea.

**[0016]** En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra diariamente, dos veces por semana, semanalmente o mensualmente. En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra dos veces por semana.

**[0017]** En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, la cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es una cantidad de dosis de aproximadamente 1 mg/kg a 50 mg/kg. En algunos aspectos que no forman parte de la invención reivindicada, la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg.

**[0018]** La administración del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo da como resultado una fibrosis y/o necrosis reducidas en relación con un control. La administración del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo da como resultado una angiogénesis mejorada en el músculo del sujeto en relación con un control. La angiogénesis mejorada puede reflejarse en un aumento del flujo sanguíneo en la patología muscular, aumento de los niveles de VEGF en suero, disminución de los niveles de creatina quinasa (CK) en suero, aumento de la puntuación de CD31 por IHC y/o niveles reducidos de sFlt-1 en suero. La del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo da como resultado una función muscular mejorada en relación con un control. La función muscular mejorada puede reflejarse en una fuerza muscular mejorada y/o resistencia a la fatiga.

**[0019]** Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**[0020]** Las presentes enseñanzas descritas en el presente documento se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción de varias formas de realización ilustrativas, cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Debe entenderse que los dibujos que se describen a continuación son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

**La Figura 1A** muestra resultados ejemplares que representan la eliminación del anticuerpo anti-Flt-1 13B4 después de que a los ratones se les administrara el anticuerpo a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa.

**La Figura 1B** muestra resultados ejemplares que representan la eliminación del anticuerpo anti-Flt-1 10G12 después de que a los ratones se les administrara el anticuerpo a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa.

**La Figura 2A** muestra resultados ejemplares que representan los niveles máximos de anticuerpos anti-Flt-1 en suero.

**La Figura 2B** muestra resultados ejemplares que representan los niveles mínimos de anticuerpos anti-Flt-1 en suero.

**La Figura 3** muestra resultados ejemplares que representan una disminución en los niveles de Flt-1 soluble libre (sFlt-1) en suero después de la administración de un anticuerpo anti-Flt-1 (13B4 o 10G12), anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo comercial (Angio) o vehículo solo para ratones *mdx*.

**La Figura 4** muestra resultados ejemplares que representan un aumento en los niveles de VEGF en suero después de la administración de un anticuerpo anti-Flt-1 (13B4 o 10G12), un anticuerpo de control de isotipo, un anticuerpo comercial (Angio) o un vehículo solo a ratones *mdx*.

**Las Figuras 5A-5D** muestran resultados ejemplares de la tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo del diafragma de ratones *mdx* a los que se les administró un anticuerpo anti-Flt-1 (13B4 o 10G12), un anticuerpo de control de isotipo o un anticuerpo comercial (Angio).

**La Figura 6A** muestra resultados ejemplares de la cuantificación del área positiva de CD31 como porcentaje del área teñida total en secciones de tejido obtenidas del músculo del diafragma. **La Figura 6B** muestra resultados ejemplares de cuantificación del área positiva de CD31 como porcentaje del área teñida total en secciones de tejido obtenidas del músculo tibial anterior (TA).

**La Figura 6B** muestra resultados ejemplares de cuantificación del área positiva de CD31 como porcentaje del área teñida total en secciones de tejido obtenidas del músculo tibial anterior (TA) de ratones *mdx* a los que se les administró un anticuerpo anti-Flt-1.

**La Figura 7** muestra resultados ejemplares que representan la unión de anticuerpos anti-Flt-1 a sFlt-1 recombinante mediante un ensayo ELISA.

**La Figura 8** muestra resultados ejemplares que representan la inhibición de la unión de sFlt-1 a VEGF por anticuerpos anti-Flt-1 en un ensayo ELISA de competición.

**La Figura 9** muestra resultados ejemplares que representan el rescate de la fosforilación de VEGF R2 por anticuerpos anti-Flt-1. Se trataron células endoteliales de vena primaria humana (HUVEC) con VEGF en presencia de anticuerpos sFlt-1 y anti-Flt-1 y se determinó el nivel de fosforilación de VEGF R2. El porcentaje de rescate indica el nivel de fosforilación de VEGF R2 en relación con el nivel de fosforilación de VEGF R2 cuando las HUVEC se trataron con VEGF y sFlt-1 solo (es decir, sin anticuerpo anti-Flt-1).

**La Figura 10** muestra resultados ejemplares que representan la inhibición de la unión de Flt-1 soluble a VEGF por anticuerpos anti-Flt-1 en un ensayo ELISA de competición.

**La Figura 11** muestra resultados ejemplares que representan la eliminación de anticuerpos anti-Flt-1 del suero durante 672 horas después de que a los ratones se les administrara el anticuerpo anti-Flt-1 a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa.

**Las Figuras 12A-12C** muestran resultados ejemplares de la tinción con CD31 de secciones de tejido del músculo del diafragma.

**Las Figuras 12D-12F** muestran resultados ejemplares de la tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo tibial anterior.

**Las Figuras 13A-13C** muestran una biodistribución ejemplar de anticuerpos anti-Flt-1 27H9, 13B4 y 21B3 en los músculos diafragma, tibial y gastrocnemio de ratones durante un transcurso de tiempo de 256 horas después de la administración del anticuerpo.

**La Figura 14A** muestra resultados ejemplares que representan los niveles máximos de anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 en la exposición máxima.

**La Figura 14B** muestra resultados ejemplares que representan los niveles mínimos del anticuerpo 21B3 anti-Flt-1.

**La Figura 15** muestra resultados ejemplares que representan sFlt-1 libre después de la administración del anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 a ratones *mdx*.

**La Figura 16** muestra resultados ejemplares que representan los niveles de VEGF después de la administración del anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 a ratones *mdx*.

**Las Figuras 17A-17E** muestran resultados ejemplares de la tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo del diafragma de ratones *mdx* a los que se les administró el anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o el anticuerpo de control de isotipo.

**La Figura 18** muestra resultados ejemplares de la cuantificación del porcentaje de positividad de CD31 normalizado en secciones de tejido obtenidas del músculo del diafragma de ratones *mdx* a los que se les administró el anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o el anticuerpo de control de isotipo.

**La Figura 19A-19E** muestra resultados ejemplares de la tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo tibial anterior de ratones *mdx* a los que se les administró anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o anticuerpo de control de isotipo.

**La Figura 20** muestra resultados ejemplares de la cuantificación del porcentaje de positividad de CD31 normalizado en secciones de tejido obtenidas del músculo tibial anterior de ratones *mdx* a los que se les administró el anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o el anticuerpo de control de isotipo.

**La Figura 21A** muestra resultados ejemplares del análisis de cromatografía líquida/espectrometría de masas de fase inversa (RP-LC/MS) para determinar el peso molecular del anticuerpo 21 B3 desglucosilado.

**La Figura 21B** muestra resultados ejemplares del análisis del patrón de glicosilación de la cadena pesada.

**Las Figuras 22A y 22B** muestran resultados ejemplares que representan el rescate de la fosforilación de VEGF R2 por anticuerpos anti-Flt-1. Se trataron células endoteliales de vena primaria humana (HUVEC) con VEGF en presencia de anticuerpos sFlt-1 y antiFlt-1 y se determinó el nivel de fosforilación de VEGF R2. El porcentaje de rescate indica el nivel de fosforilación de VEGF R2 en relación con el nivel de fosforilación de VEGF R2 cuando las HUVEC se trataron con VEGF y sFlt-1 solos (es decir, sin anticuerpo anti-Flt-1).

**La Figura 23** muestra resultados ejemplares que representan la unión de anticuerpos anti-Flt-1 a sFlt-1 recombinante mediante un ensayo ELISA.

**La Figura 24** muestra resultados ejemplares que representan niveles séricos de anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 libre y anticuerpo de control de isotipo en ratones *mdx*.

**La Figura 25** muestra resultados ejemplares que representan los niveles séricos de sFlt-1 libre en ratones *mdx* tratados con el anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o con el anticuerpo de control de isotipo.

**La Figura 26** muestra resultados ejemplares que representan los niveles séricos de VEGF en ratones *mdx* tratados con el anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o con el anticuerpo de control de isotipo.

**Las Figuras 27A-27H** muestran resultados ejemplares de tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo del diafragma de ratones *mdx* con anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o control de vehículo durante 6 (27A-27D) o 12 (27E-27H) semanas.

**Las Figuras 28A-28H** muestran resultados ejemplares de tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo gastrocnemio de ratones *mdx* a los que se les administró anticuerpo 21 B3 anti-Flt-1 o control de vehículo durante 6 semanas (28A-28D) o 12 semanas (28E-28H).

**Las Figuras 29A-29H** muestran resultados ejemplares de tinción con CD31 de secciones de tejido obtenidas del músculo tibial de ratones *mdx* a los que se les administró anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o control de vehículo durante 6 semanas (29A-29D) o 12 semanas (29E-29H).

**Las Figuras 30A-30C** muestran resultados ejemplares de la cuantificación del porcentaje de positividad de la tinción de CD31 en secciones de tejido obtenidas del diafragma, gastrocnemio y músculo tibial de ratones *mdx* a los que se les administró el anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o el anticuerpo de control del vehículo durante 6 o 12 semanas.

**Las Figuras 31A-31H** muestran resultados ejemplares de tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I de secciones de tejido obtenidas del músculo del diafragma de ratones *mdx* a los que se les administró anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o control de vehículo durante 6 semanas (31A-31D) o 12 semanas (31E-31H).

**Las Figuras 32A-32H** muestran resultados ejemplares de la tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I de secciones de tejido obtenidas del músculo gastrocnemio de ratones *mdx* a los que se les administró el anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o el control del vehículo durante 6 semanas (32A-32D) o 12 semanas (32E-32H).

**Las Figuras 33A-33H** muestran resultados ejemplares de la tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I de secciones de tejido obtenidas del músculo tibial de ratones *mdx* a los que se les administró el anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 o el control del vehículo durante 6 semanas (33A-33D) o 12 semanas (33E-33H).

**Las Figuras 34A-34C** muestran resultados ejemplares de la cuantificación del porcentaje de positividad de la tinción de colágeno tipo I en secciones de tejido obtenidas del diafragma, gastrocnemio y músculo tibial de ratones *mdx* a los que se les administró anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o anticuerpo de control de vehículo durante 6 o 12 semanas.

**Las Figuras 35A y 35B** muestran resultados ejemplares de la cuantificación del porcentaje de necrosis del músculo gastrocnemio de ratones *mdx* a los que se les administró anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o anticuerpo de control de vehículo durante 6 o 12 semanas.

**La Figura 36** muestra resultados ejemplares que representan un mapa de calor diferencial que compara el intercambio de hidrógeno/deuterio de sFlt-1 humana sola con la mezcla de sFlt-1 humana y anticuerpo anti-Flt-1 (21B3). Gris: sin protección de deuterio; azul: protección de deuterio tras la unión de Fab.

**La Figura 37** muestra resultados ejemplares que representan un mapa de calor diferencial que compara el intercambio de hidrógeno/deuterio de sFlt-1 humana sola con la mezcla de sFlt-1 humana y anticuerpo anti-Flt-1 (21C6). Gris: sin protección de deuterio; azul: protección de deuterio tras la unión de Fab.

**Las Figuras 38A-3E** muestran resultados ejemplares que representan espectros de MS/MS para péptidos identificados que contienen residuos de aminoácidos de regiones epitópicas.

## DEFINICIONES

**[0021]** Para que la presente invención se comprenda más fácilmente, a continuación se definen en primer lugar determinados términos. Se establecen definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos a lo largo de la especificación.

**[0022] Afinidad:** como se sabe en la técnica, "afinidad" es una medida de la estanqueidad con un ligando particular que se une a su pareja. En algunas formas de realización, el ligando o compañero es Flt-1 soluble. En algunas formas de realización, el ligando o compañero es un Flt-1 recombinante. En una forma de realización particular, el ligando o compañero es sFlt-1 humano. En una forma de realización particular, el ligando o compañero es un sFlt-1 recombinante. En otras formas de realización, el ligando o asociado es un anticuerpo anti-Flt-1. Las afinidades se pueden medir de diferentes maneras. En algunas formas de realización, la afinidad se mide mediante un ensayo cuantitativo. En algunas de tales formas de realización, la concentración de la pareja de unión se puede fijar para que supere la concentración del ligando para imitar las condiciones fisiológicas. Como alternativa o adicionalmente, en algunas formas de realización, la concentración de la pareja de unión y/o la concentración del ligando puede variar. En algunas de tales formas de realización, la afinidad puede compararse con una referencia en condiciones comparables (p. ej., concentraciones).

**[0023] Afinidad madurada (o anticuerpo madurado por afinidad):** como se usa en el presente documento, el término "afinidad madurada" o "anticuerpo madurado por afinidad", se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esas alteraciones. En algunas formas de realización, los anticuerpos madurados por afinidad tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por un antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir mediante cualquiera de una variedad

de procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al., BioTechnology 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante el barajado de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o marco está descrita por: Barbas et al. proc. Nat. Acad. EE. UU. 91:3809-3813 (1994); Schier y col., Gene 169: 147-155 (1995); Yelton y col., J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

**[0024] Mejora:** como se usa en el presente documento, el término "mejora" significa la prevención, reducción o paliación de un estado, o mejora del estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere, la recuperación completa o la prevención completa de una condición de enfermedad.

**[0025] Animal:** como se usa en este documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas formas de realización, "animal" se refiere a humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas formas de realización, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas formas de realización, el animal no humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas formas de realización, los animales incluyen, entre otros, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas formas de realización, un animal puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente y/o un clon.

**[0026] Anticuerpo:** como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, ya sea natural o producida total o parcialmente sintéticamente. Todos los derivados de los mismos que mantienen la capacidad de unión específica también se incluyen en el término. El término también cubre cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Dichas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o ser parcial o totalmente producidas sintéticamente. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser miembro de cualquier isotipo de inmunoglobulina, incluido cualquiera de los isotipos humanos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En ciertas formas de realización, un anticuerpo puede ser un miembro de la clase de inmunoglobulina IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, etc.). En algunas formas de realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado.

**[0027]** Como saben los expertos en la materia, los anticuerpos producidos en la naturaleza normalmente se componen de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera está compuesta por una región variable (abreviada aquí como HCVR, VH o VL y LCVR, VL o VL, respectivamente) y una región constante. La región constante de una cadena pesada comprende un dominio CH1, CH2 y CH3 (y opcionalmente un dominio CH4 en el caso de IgM e IgE). La región constante de una cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL contienen además regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), interconectadas con regiones que están más conservadas, que se denominan regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones de unión de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

**[0028] Porción de unión a antígeno:** como se usa en el presente documento, el término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a uno o más fragmentos o porciones de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, Flt-1). Los ejemplos de porciones de unión a antígeno incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VH, VL, CH1 y CL; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VH y VL de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que comprende un solo dominio variable; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; (vii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra; (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un solo dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VH y VL, están codificados por genes separados, pueden unirse mediante métodos recombinantes mediante un enlace sintético que les permite formar una única cadena proteica en la que el VH y las regiones VL se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879-5883). Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. Como alternativa o adicionalmente, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular.

**[0029]** Un fragmento de anticuerpo contiene suficiente secuencia del anticuerpo original del cual es un fragmento que se une al mismo antígeno que el anticuerpo original; en algunas formas de realización, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo original y/o compite con el anticuerpo original por la unión al antígeno.

**[0030]** Los expertos en la técnica apreciarán que el término "fragmento de anticuerpo" no implica y no se limita a ningún modo particular de generación. Se puede producir un fragmento de anticuerpo mediante el uso de cualquier metodología apropiada, que incluye, entre otros, la escisión de un anticuerpo intacto, la síntesis química y la producción recombinante. La utilidad de los fragmentos se selecciona de la misma manera que los anticuerpos intactos.

**[0031] Aproximadamente o alrededor de:** como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de", cuando se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas formas de realización, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del indicado valor de referencia a menos que se indique lo contrario o sea evidente del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

**[0032] Asociado con:** dos eventos o entidades están "asociados" entre sí, como se usa ese término en este documento, si la presencia, el nivel y/o la forma de uno está correlacionado con el del otro. Por ejemplo, se considera que una entidad particular (p. ej., un polipéptido) está asociada con una enfermedad, trastorno o condición en particular, si su presencia, nivel y/o forma se correlaciona con la incidencia y/o la susceptibilidad a la enfermedad, trastorno o condición (por ejemplo, a través de una población relevante). En algunas formas de realización, dos o más entidades están "asociadas" físicamente entre sí si interactúan, directa o indirectamente, de modo que están y permanecen en proximidad física entre sí. En algunas formas de realización, dos o más entidades que están físicamente asociadas entre sí están unidas covalentemente entre sí; en algunas formas de realización, dos o más entidades que están físicamente asociadas entre sí no están unidas entre sí de forma covalente, sino que están asociadas de forma no covalente, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno, interacción de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, magnetismo y combinaciones de las mismas.

**[0033] Vehículo o diluyente:** como se usa en el presente documento, los términos "portador" y "diluyente" se refieren a un vehículo o sustancia diluyente farmacéuticamente aceptable (p. ej., seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) útil para la preparación de una formulación farmacéutica. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada de pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

**[0034] CDR:** como se usa en el presente documento, se refiere a una región determinante de complementariedad dentro de una región variable de anticuerpo. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. Un "conjunto de CDR" o "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres o seis CDR que ocurren en una única región variable capaz de unirse al antígeno o las CDR de regiones variables de cadena ligera y pesada afines capaces de unirse al antígeno. Se han establecido ciertos sistemas en la técnica para definir límites de CDR (por ejemplo, Kabat, Chothia, etc.); los expertos en la técnica aprecian las diferencias entre estos sistemas y son capaces de comprender los límites de CDR en la medida requerida para comprender y poner en práctica la invención reivindicada.

**[0035] Anticuerpo quimérico:** como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos incluye secuencias de regiones  $V_H$  y  $V_L$  que se encuentran en una primera especie y secuencias de regiones constantes que se encuentran en una segunda especie, diferente de la primera especie. En muchas formas de realización, un anticuerpo quimérico tiene regiones  $V_H$  y  $V_L$  murinas unidas a regiones constantes humanas. En algunas formas de realización, un anticuerpo con regiones  $V_H$  y  $V_L$  humanas unidas a regiones constantes no humanas (p. ej., una región constante de ratón) se denomina "anticuerpo quimérico inverso".

**[0036] Forma de dosificación:** como se usa en el presente documento, los términos "forma de dosificación" y "forma de dosificación unitaria" se refieren a una unidad físicamente discreta de una proteína terapéutica (p. ej., un anticuerpo) para el paciente a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Se entenderá, sin embargo, que la dosificación total de la composición la decidirá el médico tratante dentro del alcance del sano juicio médico.

**[0037] Disfunción:** como se usa en este documento, el término "disfunción" se refiere a una función anormal. La disfunción de una molécula (p. ej., una proteína) puede ser causada por un aumento o disminución de una actividad asociada con tal molécula. La disfunción de una molécula puede estar causada por defectos asociados con la propia molécula o con otras moléculas que interactúan directa o indirectamente con la molécula o la regulan.

**[0038] Epítipo:** como se usa en el presente documento, incluye cualquier resto que sea reconocido específicamente por un componente de unión a inmunoglobulina (p. ej., anticuerpo, fragmento de anticuerpo del mismo, receptor). En algunas formas de realización, un epítipo se compone de una pluralidad de átomos o grupos químicos en un antígeno. En algunas formas de realización, dichos átomos o grupos químicos están expuestos en la superficie cuando el antígeno adopta una conformación tridimensional relevante. En algunas formas de realización, tales átomos o grupos químicos están físicamente cerca unos de otros en el espacio cuando el antígeno adopta tal conformación. En algunas formas de realización, al menos algunos de dichos átomos químicos son grupos que se separan físicamente entre sí cuando el antígeno adopta una conformación alternativa (p. ej., se linealiza).



**[0039] Región Fc:** como se usa aquí, el término "región Fc" se refiere a un dímero de dos "polipéptidos Fc", comprendiendo cada "polipéptido Fc" la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. En algunas formas de realización, una "región Fc" incluye dos polipéptidos Fc unidos por uno o más enlaces disulfuro, enlazadores químicos o enlazadores peptídicos. "Polipéptido Fc" se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y también puede incluir parte o la totalidad de la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgG, el "polipéptido Fc" comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 (Cy2) y Cgamma3 (Cy3) y la parte inferior de la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cy2. Aunque los límites del polipéptido Fc pueden variar, el polipéptido Fc de cadena pesada de IgG humana generalmente se define para comprender residuos que comienzan en T223 o C226 o P230, hasta su extremo carboxilo, donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat et al. (1991, NIH Publicación 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, VA). Para IgA, el polipéptido Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Calfa2 (Ca2) y Calfa3 (Ca3) y la parte inferior de la bisagra entre Calfa1 (Ca1) y Ca2. Una región Fc puede ser sintética, recombinante o generada a partir de fuentes naturales como IVIG.

**[0040] Marco o región marco:** como se usa en el presente documento, se refiere a las secuencias de una región variable menos las CDR. Debido a que una secuencia de CDR puede ser determinada por diferentes sistemas, igualmente una secuencia marco está sujeta a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR dividen las regiones marco de las cadenas pesada y ligera en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se ubica entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, tal como la denominan otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Tal como se usa en el presente documento, un FR representa una de las cuatro subregiones, FR1, por ejemplo, representa la primera región marco más cercana al extremo amino terminal de la región variable y 5' con respecto a CDR1, y FR representa dos o más de las subregiones que constituyen una región marco.

**[0041] Vida media:** como se usa en el presente documento, el término "vida media" es el tiempo requerido para que una cantidad tal como la concentración o actividad de proteína caiga a la mitad de su valor medido al comienzo de un período de tiempo.

**[0042] Alta afinidad:** como se usa en este documento, el término "alta afinidad", cuando se refiere a un anticuerpo de tipo IgG, se refiere a un anticuerpo que tiene una  $KD$  de  $10^{-8}$  M o menos, más preferiblemente  $10^{-9}$  M o menos e incluso más preferiblemente  $10^{-10}$  M o menos para un dominio de Flt-1. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, unión de "alta afinidad" por un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una  $KD$  de  $10^{-7}$  M o menos, más preferiblemente  $10^{-8}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $10^{-9}$  M o menos.

**[0043] Anticuerpo humano:** como se usa en el presente documento, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes generadas (o ensambladas) a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, los anticuerpos (o componentes de anticuerpos) pueden considerarse "humanos" aunque sus secuencias de aminoácidos incluyan residuos o elementos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., incluyen variaciones de secuencia, por ejemplo, que pueden (originalmente) haberse introducido por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo, en una o más CDR y en particular CDR3.

**[0044] Anticuerpo monoclonal humano:** como se usa en el presente documento, se pretende que se refiera a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

**[0045] Humanizado:** como se sabe en la técnica, el término "humanizado" se usa comúnmente para referirse a anticuerpos (o componentes de anticuerpos) cuya secuencia de aminoácidos incluye secuencias de las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo de referencia creado en una especie no humana (p. ej., un ratón, una llama), pero también incluye modificaciones en esas secuencias en relación con el anticuerpo de referencia destinado a hacerlos más "similares a los humanos", es decir, más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo (o componente de anticuerpo) "humanizado" es uno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de interés y que tiene una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos como la de un anticuerpo humano, y un determinante complementario región (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos como la de un anticuerpo no humano (p. ej., un ratón, una llama). Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, inmunoglobulina donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo

humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una región constante de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una región C<sub>H</sub>1, bisagra, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 y, opcionalmente, una región C<sub>H</sub>4 de una región constante de cadena pesada. Un anticuerpo humanizado contiene regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> humanizadas.

**[0046] Hipertrofia:** como se usa en el presente documento, el término "hipertrofia" se refiere al aumento de volumen de un órgano o tejido debido al aumento de tamaño de las células que lo componen.

**[0047] Mejorar, aumentar o reducir:** como se usa en este documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición de referencia, como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en este documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en este documento. Un "individuo de control" es un individuo afectado por la misma forma de enfermedad que el individuo que recibe tratamiento, que tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que recibe tratamiento (para garantizar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el (los) individuo(s) de control son comparables).

**[0048] Inhibición:** como se usa en el presente documento, los términos "inhibición", "inhibir" e "inhibido" se refieren a procesos o métodos para disminuir o reducir la actividad y/o la expresión de una proteína o un gen de interés. Por lo general, inhibir una proteína o un gen se refiere a reducir la expresión o una actividad relevante de la proteína o el gen en al menos un 10 % o más, por ejemplo, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, o una disminución en la expresión o la actividad relevante de más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100 veces o más medido por uno o más métodos descritos en este documento o reconocidos en la técnica.

**[0049] In Vitro:** como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que ocurren en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en un cultivo celular, *etc.*, en lugar de dentro de un organismo multicelular.

**[0050] In vivo:** como se usa en el presente documento, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (a diferencia de, por ejemplo, los sistemas *in vitro*).

**[0051] Anticuerpo aislado:** como se usa aquí, el término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a Flt-1). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

**[0052] K<sub>a</sub>:** Como se usa aquí, se refiere a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "K<sub>d</sub>", como se usa aquí, se refiere a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término "K<sub>D</sub>", como se usa aquí, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de K<sub>d</sub> a K<sub>a</sub> (es decir, K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub>) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K<sub>D</sub> para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K<sub>D</sub> de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferiblemente usando un sistema biosensor tal como un sistema BIAcore®.

**[0053] Reorganización de cadenas ligeras:** como se usa en el presente documento, el término "reorganización de cadenas ligeras" se refiere a un paso de maduración de afinidad en el que la secuencia de cadenas pesadas se mantiene constante y se genera una biblioteca de secuencias de cadenas ligeras. La biblioteca de cadenas ligeras se analiza frente a la cadena pesada para identificar anticuerpos con afinidad de unión mejorada. La afinidad de unión mejorada puede estar en los rangos nanomolar o picomolar.

**[0054] Anticuerpo monoclonal:** como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" pretende hacer referencia a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

**[0055] Farmacéuticamente aceptable:** tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación riesgo/beneficio razonable.

**[0056] Polipéptido:** como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la materia entenderá que el término no se limita a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos entre sí a través de un enlace de péptido. Como saben los expertos en la técnica, los polipéptidos pueden procesarse y/o modificarse.

**[0057] Prevenir:** como se usa en este documento, el término "prevenir" o "prevención", cuando se usa en relación con la aparición de una enfermedad, trastorno y/o condición, se refiere a reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección. Consulte la definición de "riesgo".

**[0058] Proteína:** como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si un solo polipéptido es la unidad de funcionamiento discreta y no requiere una asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos para formar la unidad de funcionamiento discreta, los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente. Si la unidad funcional discreta consta de más de un polipéptido que se asocia físicamente entre sí, el término "proteína" se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y funcionan juntos como la unidad discreta.

**[0059] Riesgo:** como se entenderá por el contexto, un "riesgo" de una enfermedad, trastorno y/o afección comprende la probabilidad de que un individuo particular desarrolle una enfermedad, trastorno y/o afección (p. ej., DMD). En algunas formas de realización, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas formas de realización, el riesgo es de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta el 100 %. En algunas formas de realización, el riesgo se expresa como un riesgo relativo a un riesgo asociado con una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia. En algunas formas de realización, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia tienen un riesgo conocido de una enfermedad, trastorno, afección y/o evento (p. ej., DMD). En algunas formas de realización, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia son de individuos comparables a un individuo particular. En algunas formas de realización, el riesgo relativo es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

**[0060] Unión selectiva:** como se usa en el presente documento, "unión selectiva", "se une selectivamente", "unión específica" o "se une específicamente" se refiere, con respecto a un resto de unión y un objetivo, asociación preferencial de una fracción de unión a un objetivo y no a una entidad que no es el objetivo. Puede ocurrir un cierto grado de unión no específica entre un resto de unión y un no objetivo. En algunas formas de realización, un resto de unión se une selectivamente a un objetivo si la unión entre el resto de unión y el objetivo es mayor de 2 veces, mayor de 5 veces, mayor de 10 veces o mayor de 100 veces en comparación con la unión de el resto de unión y un no objetivo. En algunas formas de realización, un resto de unión se une selectivamente a un objetivo si la afinidad de unión es inferior a aproximadamente  $10^{-5}$  M, inferior a aproximadamente  $10^{-6}$  M, inferior a aproximadamente  $10^{-7}$  M, inferior a aproximadamente  $10^{-8}$  M o inferior que alrededor de  $10^{-9}$  M.

**[0061] Músculo estriado:** como se usa en este documento, el término "músculo estriado" se refiere al tejido muscular multinucleado con una disposición regular de sus unidades contráctiles intracelulares, sarcómeros, que conducen a la aparición de estrías usando microscopía y bajo control voluntario. Por lo general, el músculo estriado puede ser músculo cardíaco, músculo esquelético y músculos branquioméricos.

**[0062] Músculo liso:** como se usa en el presente documento, el término "músculo liso" se refiere a músculo no estriado controlado involuntariamente, incluyendo músculo unitario y de múltiples unidades.

**[0063] Sujeto:** como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un ser humano o cualquier animal no humano (p. ej., ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdos, ovejas, caballos o primates). Un ser humano incluye formas prenatales y posnatales. En muchas formas de realización, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta a un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa aquí de manera intercambiable con "individuo" o "paciente". Un sujeto puede padecer o ser susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede presentar o no síntomas de la enfermedad o trastorno.

**[0064] Sustancialmente:** como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Una persona con conocimientos ordinarios en las artes biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si es que alguna vez, se completan y/o proceden a completarse o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa aquí para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

**[0065] Homología sustancial:** la frase "homología sustancial" se usa aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien sabido por los expertos en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrofóbicos" o "hidrofílicos" y/o tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo se puede considerar una sustitución "homóloga".

**[0066]** Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos pueden compararse usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de

aminoácidos. Ejemplos de dichos programas se describen en Altschul, et al., herramienta básica de búsqueda de alineación local, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxeianis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente suelen proporcionar una indicación del grado de homología. En algunas formas de realización, se considera que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un tramo relevante de residuos. En algunas formas de realización, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas formas de realización, el tramo relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

**[0067] Identidad sustancial:** la frase "identidad sustancial" se usa aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, dos secuencias generalmente se consideran "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos pueden compararse usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Tales programas ejemplares se describen en Altschul, et al., herramienta de búsqueda de alineación local básica, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxeianis et al., Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente suelen proporcionar una indicación del grado de identidad. En algunas formas de realización, se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un tramo relevante de residuos. En algunas formas de realización, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas formas de realización, el tramo relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

**[0068] Resonancia de plasmones superficiales:** como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones de unión específicas en tiempo real, por ejemplo, mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, como mediante el uso de un Biacore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para más descripciones, véase Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. clin. 51: 19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Jonsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

**[0069] Padece:** un individuo que "padece" una enfermedad, trastorno y/o afección al que se le ha diagnosticado o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección como, por ejemplo, DMD.

**[0070] Susceptible a:** Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas formas de realización, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección puede no exhibir síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas formas de realización, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, afección o evento (por ejemplo, DMD) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (3) aumento y/o disminución de la expresión y/o actividad de una proteína asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno, afección y/o evento (5) haber sufrido, planear someterse o requerir un trasplante. En algunas formas de realización, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas formas de realización, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

**[0071] Tejidos objetivo:** como se usa en el presente documento, el término "tejidos objetivo" se refiere a cualquier tejido que esté afectado por una enfermedad a tratar tal como DMD. En algunas formas de realización, los tejidos objetivo incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad, incluidos, entre otros, atrofia muscular, deformación esquelética, miocardiopatía, isquemia muscular, deterioro cognitivo y deterioro de la función respiratoria. En alguna forma de realización, el tejido objetivo es músculo liso, músculo estriado o músculo cardíaco.

**[0072] Cantidad terapéuticamente efectiva:** como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente terapéutico significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que sufre o es susceptible de padecer una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. Los expertos en la materia apreciarán que una cantidad terapéuticamente eficaz se administra normalmente a través de un régimen de

dosificación que comprende al menos una dosis unitaria.

**[0073] Tratamiento:** como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratamiento" o "tratado" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular, como por ejemplo, DMD. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad y/o muestra solo signos tempranos de la enfermedad con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con la enfermedad.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0074]** Varios aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

### *Distrofia muscular de Duchenne (DMD)*

**[0075]** La DMD es una enfermedad caracterizada por el deterioro progresivo de los músculos y la pérdida de funciones relacionadas con los músculos en todo el cuerpo. Los anticuerpos anti-Flt-1 o sus fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden ser para ralentizar, retrasar o prevenir el deterioro de los músculos, regenerar los músculos y revertir, eliminar, retrasar, prevenir o minimizar la fibrosis, la inflamación y otros síntomas o características asociadas con DMD y otras distrofias musculares en varios tejidos musculares.

### Tejidos musculares

**[0076]** Hay dos tipos principales de tejido muscular en un animal, músculo estriado y músculo liso. Como se usa en el presente documento, el término "músculo estriado" se refiere a tejidos musculares que contienen sarcómeros repetitivos. El músculo estriado tiende a estar bajo control voluntario y unido al esqueleto. El músculo estriado permite el movimiento voluntario del cuerpo e incluye los principales grupos musculares, incluidos los cuádriceps, gastrocnemio, bíceps, tríceps, trapecio, deltoides y muchos otros. El músculo estriado tiende a ser muy largo y muchos músculos estriados pueden funcionar de forma independiente. Sin embargo, algunos músculos estriados no están unidos al esqueleto, incluidos los de la boca, el ano, el corazón y la parte superior del esófago.

**[0077]** El músculo liso, por otro lado, tiene una estructura muy diferente. En lugar de una serie de músculos largos con inserciones esqueléticas separadas, el músculo liso tiende a organizarse en láminas continuas con enlaces mecánicos entre las células del músculo liso. El músculo liso a menudo se localiza en las paredes de los órganos huecos y por lo general no está bajo control voluntario. Los músculos lisos que recubren un órgano en particular deben soportar la misma carga y contraerse al mismo tiempo. El músculo liso funciona, al menos en parte, para manejar los cambios de carga en los órganos huecos causados por el movimiento y/o cambios en la postura o la presión. Esta doble función significa que el músculo liso no solo debe poder contraerse como el músculo estriado, sino que también debe poder contraerse tónicamente para mantener las dimensiones del órgano frente a cargas sostenidas. Ejemplos de músculos lisos son los que recubren los vasos sanguíneos, los bronquiolos, la vejiga y el tracto gastrointestinal, como el recto.

**[0078]** La fuerza de un músculo depende del número y tamaño de las células del músculo y de su disposición anatómica. Aumentar el diámetro de una fibra muscular ya sea mediante la síntesis de nuevas miofibrillas (hipertrofia) y/o la formación de más células musculares (hiperplasia) aumentará la capacidad de generación de fuerza del músculo.

**[0079]** Los músculos también se pueden agrupar por ubicación o función. En algunas formas de realización, el anticuerpo Flt-1 o su fragmento de unión a antígeno se dirige a uno o más músculos de la cara, uno o más músculos para la masticación, uno o más músculos de la lengua y el cuello, uno o más músculos del tórax, uno o más músculos de la cintura pectoral y de los brazos, uno o más músculos del brazo y del hombro, uno o más músculos ventrales y dorsales del antebrazo, uno o más músculos de la mano, uno o más músculos del erector de la columna, uno o más músculos de la cintura pélvica y las piernas, y/o uno o más músculos de la pata delantera y el pie.

**[0080]** En algunas formas de realización, los músculos de la cara incluyen, entre otros, músculos intraoculares tales como ciliar, dilatador del iris, esfínter del iris; músculos del oído tales como auriculares, temporoparietalis, stapedius, tensor tympani; músculos de la nariz tales como procerus, nasalis, dilatator naris, depressor septi nasi, levator labii superioris alaeque nasi; músculos de la boca tales como levator anguli oris, depressor anguli oris, orbicularis oris, Buccinator, Zygomaticus Major y Minor, Platysma, Levator Labii Superioris, Depressor Labii Inferioris, Risorius, Mentalis y/o Corrugator Supercilii.

**[0081]** En algunas formas de realización, los músculos de la masticación incluyen, entre otros, masetero, temporal, pterigoideo medial, pterigoideo lateral. En algunas formas de realización, los músculos de la lengua y el cuello incluyen, entre otros, geniogloso, estilogloso, palatogloso, hiogloso, digástrico, estilohioideo, milohioideo, geniohioideo, omohioideo, esternohioideo, esternotiroideo, tirohioideo, esternocleidomastoideo, escaleno anterior, escaleno medio,

y/o escaleno posterior.

**[0082]** En algunas formas de realización, los músculos del tórax, la cintura pectoral y los brazos incluyen, entre otros, subclavio, pectoral mayor, pectoral menor, recto abdominal, oblicuo abdominal externo, oblicuo abdominal interno, transverso del abdomen, diafragma, intercostales externos, intercostales internos, serrato anterior, trapecio, elevador de la escápula, romboides mayor, romboides menor, dorsal ancho, deltoides, subescapular, supraespinoso, infraespinoso, redondo mayor, redondo menor y/o coracobraquial.

**[0083]** En algunas formas de realización, los músculos del brazo y el hombro incluyen, pero no se limitan a bíceps braquial-cabeza larga, bíceps braquial-cabeza corta, tríceps braquial-cabeza larga, tríceps braquial-cabeza lateral, tríceps braquial-cabeza medial, ancóneo, pronador redondo, supinador y/o braquial.

**[0084]** En algunas formas de realización, los músculos del antebrazo ventral y dorsal incluyen, pero no se limitan a Brachioradialis, Flexor carpi radialis, Flexor carpi ulnaris, Palmaris longus, Extensor carpi ulnaris, Extensor carpi radialis longus, Extensor carpi radialis brevis, Extensor digitorum, Extensor digiti minimi.

**[0085]** En algunas formas de realización, los músculos de la mano incluyen, entre otros, músculos intrínsecos de la mano tales como tenar, abductor corto del pulgar, flexor corto del pulgar, oponente del pulgar, hipotenar, abductor digiti minimi, flexor digiti minimi brevis, oponente digiti minimi, palmar interosei, dorsal interosei y/o lumbricales.

**[0086]** En algunas formas de realización, los músculos del erector de la columna incluyen, pero no se limitan a cervical, espinal, longísimo y/o iliocostal.

**[0087]** En algunas formas de realización, los músculos de la cintura pélvica y las piernas incluyen, entre otros, Psoas Major, iliaco, cuadrado femoral, aductor largo, aductor corto, aductor mayor, grácil, sartorio, cuádriceps femoral tal como, rectus femoris, vastus lateralis, vastus medialis, vastus intermedius, gastrocnemius, fibular (peroneo) largo, Soleus, Gluteus maximus, Gluteus medius, Gluteus minimus, Isquiotibiales: Bíceps femoral: Cabeza larga, Isquiotibiales: Bíceps femoral: Cabeza corta, Isquiotibiales: Semitendinoso, Isquiotibiales: semimembranoso, tensor de la fascia lata, pectíneo y/o tibial anterior.

**[0088]** En algunas formas de realización, los músculos de la pata delantera y el pie incluyen, pero no se limitan a extensor digitorum longus, extensor hallucis longus, peroneus brevis, plantaris, tibialis posterior, flexor hallucis longus, extensor digitorum brevis, extensor hallucis brevis, abductor hallucis, flexor hallucis brevis, abductor digiti minimi, flexor digiti minimi, oponens digiti minimi, extensor digitorum brevis, lumbricales del pie, quadratus plantae o flexor accessorius, flexor digitorum brevis, dorsal interosei, y/o plantar interosei.

**[0089]** Los objetivos musculares ejemplares se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1.

<b>ORBICULARIS OCULI</b>			
Intraocular: ciliar, dilatador de iris, esfínter de iris			
Oído: auriculares, temporoparietalis, stapedius, tensor del tímpano			
Nariz: procerus, nasalis, dilatator naris, depressor septi nasi, levator labii superioris alaeque nasi			
Boca: elevador del ángulo de la boca, depresor del ángulo de la boca, orbicular de la boca			
Buccinador	Cigomático mayor y menor	platisma	Levator Labii Superioris
Depresor Labii Inferioris	Risorio	Mentalis	Corrugador Superciliar
Anconeo	Pronador redondo	Supinador	Braquial
<b>MÚSCULOS DE LA MASTICACIÓN</b>			
Masetero	Temporal	Pterigoideo medial	Pterigoideo lateral
<b>MÚSCULOS DE LA LENGUA Y EL CUELLO</b>			
Geniogloso	Estilogloso	Palatogloso	Hiogloso
Digástrico	Estilohioideo	Milohioideo	Geniohioideo
Omohioideo	Esternohioideo	Esternotiroideo	Tirohioideo
Esternocleidomastoideo	Escaleno anterior	Escaleno Medio	Escaleno posterior
<b>MÚSCULOS DEL TÓRAX, CINTURA PECTORAL Y BRAZOS</b>			
Subclavio	Pectoral mayor	Pectoral menor	Recto abdominal
Oblicuo abdominal externo	Oblicuo abdominal interno	Transverso del abdomen	Diafragma
Intercostales externos	Intercostales internos	Serrato anterior	Trapecio
Elevador de la escápula	Romboideo Mayor	Romboideo menor	Dorsal ancho
Deltoides	Subescapular	Supraespinoso	Infraespinoso
Redondo mayor	Redondo menor	Coracobraquialis	

(Continuación)

<b>BRAZO Y HOMBRO</b>			
Bíceps braquial-Cabeza larga	Bíceps braquial-Cabeza corta	Tríceps braquial-Cabeza larga	Tríceps braquial-Cabeza lateral
Tríceps braquial-Cabeza medial	Anconeo	Pronador redondo	Supinador
Braquial			
<b>MÚSCULOS DEL ANTEBRAZO: Ventral y Dorsal</b>			
Braquiorradial	Flexor radial del carpo	Flexor cubital del carpo	Palmaris largo
Extensor cubital del carpo	Extensor radial largo del carpo	Extensor carpi radialis brevis	Extensor de los dedos
Extensor digiti minimi	Erector de la columna: cervical	Erector de la columna: espinal	Erector de la columna: longísimo
Erector de la columna: iliocostal			
Músculos intrínsecos de la mano: tenar, abductor pollicis brevis, flexor pollicis brevis y el opponens pollicis			
Músculos intrínsecos de la mano: hipotenar, abductor digiti minimi, flexor digiti minimi brevis y oponentes digiti minimi			
Músculos intrínsecos de la mano: interóseos palmares, interóseos dorsales y lumbricales			
<b>MÚSCULOS DE LA CINTURA PÉLVICA Y LAS PIERNAS</b>			
Iliopsoas: Psoas Mayor	Iliopsoas: Ilíaco	cuadrado femoral	Aductor largo
Aductor corto	Aductor mayor	Grácil	Sartorio
Cuádriceps femoral: recto femoral	Cuádriceps femoral: vasto lateral	Cuádriceps femoral: vasto medial	Cuádriceps femoral: vasto intermedio
Gastrocnemio	Fibular (peroneo) largo	Sóleo	Glúteo mayor
Glúteo medio	Glúteo menor	Isquiotibiales: bíceps femoral: cabeza larga	Isquiotibiales: bíceps femoral: cabeza corta
Isquiotibiales: Semitendinoso	Isquiotibiales: Semimembranoso	Tensor de la fascia lata	Pectíneo
Tibial anterior			
<b>MÚSCULOS DE LA PIERNA DELANTERA Y DEL PIE</b>			
Extensor largo de los dedos	Extensor largo del dedo gordo	Peroneo corto	Plantaris
Tibial posterior	Flexor largo del dedo gordo	Extensor corto de los dedos	Extensor corto del dedo gordo
Abductor del dedo gordo del pie	Flexor corto del dedo gordo	Abductor digiti minimi	Flexor digiti minimi
Opponens digiti minimi	Extensor corto de los dedos	Lumbricales del pie	Quadratus plantae o flexor accesorio
Flexor corto de los dedos	Interóseos dorsales	Interóseos plantares	

Distrofia muscular

- 5 [0090] Las distrofias musculares son un grupo de trastornos hereditarios que causan la degeneración del músculo, lo que conduce a movimientos débiles y alterados. Una característica central de todas las distrofias musculares es que son de naturaleza progresiva. Las distrofias musculares incluyen, pero no se limitan a: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares de cinturas y distrofia miotónica Tipos 1 y 2, incluida la forma congénita de distrofia miotónica Tipo 1. Los síntomas pueden variar según el tipo de distrofia muscular con algunos o todos los músculos afectados.
- 10 Los síntomas ejemplares de distrofias musculares incluyen retraso en el desarrollo de las habilidades motoras musculares, dificultad para usar uno o más grupos de músculos, dificultad para tragar, hablar o comer, babeo, párpados caídos, caídas frecuentes, pérdida de fuerza en un músculo o grupo de músculos en la edad adulta, pérdida de tamaño muscular, problemas para caminar debido a debilidad o biomecánica alterada del cuerpo y/o deterioro cognitivo o conductual/retraso mental.

- 15 [0091] Aunque no existen curas conocidas para las distrofias musculares, se usan varios tratamientos de apoyo que incluyen tanto terapias sintomáticas como modificadoras de la enfermedad. Los corticosteroides, los inhibidores de la ECA, los bloqueadores de los receptores de angiotensina, la fisioterapia, los dispositivos ortopédicos, las sillas de ruedas u otros dispositivos médicos de asistencia para las AVD y la función pulmonar se usan comúnmente en las

distrofias musculares. Los marcapasos cardíacos se utilizan para prevenir la muerte súbita por arritmias cardíacas en la distrofia miotónica. Los agentes antimiotónicos que mejoran los síntomas de la miotonía (incapacidad para relajarse) incluyen mexilitina y, en algunos casos, fenitoína, procainamida y quinina.

## 5 Distrofia muscular de Duchenne

**[0092]** La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una forma de distrofia muscular recesiva ligada al cromosoma X que da como resultado la degeneración muscular y la muerte final. La DMD se caracteriza por debilidad en los músculos proximales, marcha anormal, hipertrofia en los músculos gastrocnemio (pantorrilla) y creatina quinasa elevada. Muchos pacientes con DMD son diagnosticados alrededor de los 5 años, cuando los síntomas/signos suelen volverse más evidentes. Las personas afectadas por lo general dejan de caminar entre los 10 y los 13 años y mueren entre los 20 y los 30 años o antes debido a complicaciones respiratorias y cardiomiopatía.

**[0093]** En individuos afectados con DMD, los niveles de creatina quinasa en suero pueden aumentar más de 10 veces en comparación con los individuos no afectados. En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada a un individuo afectado da como resultado un nivel de creatina quinasa sérica reducido en comparación con el nivel de referencia antes del tratamiento. Por lo general, el nivel de referencia se mide inmediatamente antes del tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado un nivel de creatina quinasa sérica reducido en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. en comparación con el nivel basal de creatina quinasa sérica inmediatamente antes del tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado un nivel de creatina quinasa sérica reducido a menos de aproximadamente 3500 UI/L, 3000 UI/L, 2500 UI/L, 2000 UI/L, 1500 UI/L, 1000 UI/L, 750 UI/L, 500 UI/L, 250 UI/L, 100 UI/L, 90 UI/L, 80 UI/L, 70 UI/L o 60 UI/L. En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado un nivel de creatina quinasa sérica reducido en comparación con el nivel de creatina quinasa sérica en sujetos que no reciben tratamiento.

**[0094]** El trastorno DMD está causado por una mutación en el gen de la distrofina, ubicado en el cromosoma X humano, que codifica la proteína distrofina, un componente estructural importante dentro del tejido muscular que proporciona estabilidad estructural al complejo distroglicano (DGC) de la membrana celular. La distrofina une la red interna de filamentos de actina citoplásmica y la matriz extracelular, proporcionando fuerza física a las fibras musculares. En consecuencia, la alteración o ausencia de distrofina da como resultado un desgarramiento anormal de la membrana sarcolémica y necrosis de las fibras musculares. Si bien ambos sexos pueden portar la mutación, las mujeres rara vez presentan signos graves de la enfermedad.

**[0095]** Un síntoma principal de la DMD es la debilidad muscular asociada con el desgaste muscular, siendo típicamente afectados primero los músculos voluntarios, afectando especialmente los músculos de las caderas, el área pélvica, los muslos, los hombros y los músculos de la pantorrilla. La debilidad muscular también ocurre en los brazos, el cuello y otras áreas. Las pantorrillas a menudo se agrandan. Los signos y síntomas suelen aparecer antes de los 6 años y pueden aparecer incluso en la infancia. La miocardiopatía ocurre en personas con DMD generalmente después de los 18 años. Otros síntomas físicos incluyen, entre otros, retraso en la capacidad para caminar de forma independiente, dificultad progresiva para caminar, dar pasos o correr, y pérdida eventual de la capacidad para caminar (generalmente por la edad de 12 años); caídas frecuentes; fatiga; dificultad con las habilidades motoras (correr, brincar, saltar); aumento de la lordosis lumbar, que conduce a un acortamiento de los músculos flexores de la cadera; alteración de la funcionalidad del tendón de Aquiles y los isquiotibiales, fibrosis en el tejido conectivo; deformidades de las fibras musculares; seudohipertrofia (agrandamiento) de los músculos de la lengua y la pantorrilla causada por la sustitución del tejido muscular por grasa y tejido conjuntivo; mayor riesgo de trastornos neuroconductuales (p. ej., TDAH), trastornos del aprendizaje (dislexia) y debilidades no progresivas en habilidades cognitivas específicas (en particular, memoria verbal a corto plazo); deformidades esqueléticas (incluyendo escoliosis en algunos casos).

**[0096]** Los cambios en el músculo observados en la DMD van acompañados de un aumento en el tejido conjuntivo, es decir, el desarrollo de fibrosis, y son el resultado de procesos reactivos o reparativos que implican factores mecánicos, humorales y/o celulares. La falta de distrofina funcional conduce a la inestabilidad de las membranas de las fibras musculares y, como resultado, las células son menos resistentes al cizallamiento mecánico y propensas a una entrada excesiva de electrolitos que da como resultado daño tisular. A medida que se daña el tejido muscular en la DMD, la recuperación se ve limitada por la capacidad de proliferación de las células satélite. Esto conduce a necrosis, inflamación, fibrosis y reemplazo de células grasas. El aumento en el tejido conectivo ocurre temprano en el proceso de la enfermedad, ya que el tejido conectivo areolar que envuelve cada miocito y cubre el sarcolema (es decir, el endomisio) aumenta antes del daño muscular observable. El aumento del tejido conjuntivo colágeno es un factor en la patología muscular en la DMD, que afecta adversamente el suministro de nutrientes al miocito afectado y, secundariamente, afecta la fuerza muscular y la edad de la pérdida de la deambulación.

**[0097]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Fli-1, o fragmento del mismo que se une al antígeno, *in vivo* da como resultado una disminución de la fibrosis del tejido muscular. En algunas formas de realización, el músculo es músculo esquelético. En formas de realización particulares, el músculo es el músculo cardíaco, el músculo del diafragma, el músculo gastrocnemio y/o el músculo tibial anterior (TA). En algunas formas de realización, la disminución de la fibrosis se demuestra mediante la disminución de la tinción de colágeno. En algunas



formas de realización, el colágeno en el colágeno Tipo I. En algunas formas de realización, la disminución de la fibrosis se puede medir, por ejemplo, midiendo el porcentaje de área positiva de colágeno en el músculo de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, el porcentaje de área positiva para colágeno en el músculo del diafragma de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser al menos alrededor del 3,0 %, alrededor del 3,5 %, alrededor del 4,0 %, alrededor del 4,5 %, alrededor del 5,0 %, alrededor del 5,5 %, alrededor del 6,0 %, alrededor del 6,5 %, alrededor del 7,0 %, alrededor del 7,5 %, alrededor del 8,0 %, alrededor del 8,5 % o alrededor del 9,0 % del área total del tejido. En una forma de realización particular, el porcentaje de área positiva de colágeno en el músculo del diafragma de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1 puede ser significativamente menor que el porcentaje de área positiva de colágeno en el músculo del diafragma de ratones a los que se les administró un anticuerpo de control de isotipo.

**[0098]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento del mismo que se une al antígeno, *in vivo* da como resultado una disminución de la necrosis del tejido muscular. En algunas formas de realización, el músculo es músculo esquelético. En formas de realización particulares, el músculo es el músculo cardíaco, el músculo del diafragma, el músculo gastrocnemio y/o el músculo tibial anterior (TA). En algunas formas de realización, la disminución de la necrosis se puede medir, por ejemplo, midiendo el porcentaje de área positiva de necrosis en el músculo de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, el porcentaje de área positiva de necrosis en el músculo gastrocnemio de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede ser al menos aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,45 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,35 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,25 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,15 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,05 % o aproximadamente 0,025 % del área total del tejido. En una forma de realización particular, el porcentaje de área positiva de necrosis en el músculo gastrocnemio de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1 puede ser significativamente menor que el porcentaje de área positiva de necrosis en el músculo gastrocnemio de ratones a los que se les administró un anticuerpo de control de isotipo.

**[0099]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, *in vivo* da como resultado un aumento de la fuerza muscular y/o la resistencia a la fatiga.

### **Receptor Flt-1**

**[0100]** El receptor Flt-1, también conocido como receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1) o Flt-1, es un receptor que está codificado por el gen FLT1 y se expresa en las membranas celulares de las células endoteliales y monocitos. La familia de glicoproteínas señalizadoras del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) actúa como potentes promotores de la angiogénesis durante la embriogénesis y el crecimiento posnatal. Específicamente, se ha demostrado que la unión del ligando de VEGF-A con los receptores de VEGF promueve la permeabilidad vascular y también desencadena la migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales, y las células endoteliales recién formadas proporcionan la estructura básica de nuevos vasos. La molécula señal dominante de VEGF para la angiogénesis, VEGF-A, media su señal a través del receptor 1 de VEGF (VEGFR-1, también conocido como Flt-1) y el receptor 2 de VEGF (VEGFR-2, también conocido como Flk-1). También existe una forma soluble de Flt-1 (sFlt-1), pero carece de un dominio de señalización intracelular y, por lo tanto, se cree que solo sirve en una capacidad reguladora al secuestrar VEGF-A u otros ligandos que se unen a él. sFlt-1 y otras moléculas que contienen sitios de unión a Flt-1 que no están vinculados a una vía de transducción de señales intracelulares se denominan "receptores señuelo". Los receptores Flt-1 y Flk-1 contienen un dominio de unión a VEGF-A extracelular y un dominio de tirosina quinasa intracelular, y ambos muestran expresión durante la etapa de desarrollo y la regeneración tisular en hemangioblastos y linajes de células endoteliales. Flt-1 tiene una afinidad de unión aproximadamente 10 veces mayor por VEGF-A ( $K_D \sim 2\text{-}10\text{ pM}$ ) en comparación con Flk-1, pero una actividad de tirosina quinasa más débil indica que la transducción de señales angiogénicas después de la unión de VEGF-A a Flt-1 es comparativamente más débil que la como resultado de la unión de VEGF-A a Flk-1. Como tal, los ratones homocigóticos con el gen Flt-1 desactivado mueren en la etapa embrionaria debido a la sobreproducción de células endoteliales y la desorganización de los vasos sanguíneos. Inversamente, los ratones homocigóticos con el gen Flk-1 desactivado mueren por defectos en el desarrollo de los vasos sanguíneos organizados debido a la falta de formación de islas de sangre en el saco vitelino durante la embriogénesis. Tanto los receptores Flt-1 como Flk-1 son necesarios para el desarrollo normal, pero el aumento selectivo de la concentración de VEGF-A puede permitir una mayor unión al receptor Flk-1 e inducir un efecto proangiogénico que aumenta la densidad capilar y facilita la regeneración de músculo, reducción de la fibrosis y la inflamación, y mitigación de los síntomas y características asociados con DMD y otras distrofias musculares en varios tejidos musculares.

**[0101]** Como se usa en el presente documento, el término "receptor Flt-1" se refiere a receptores Flt-1 tanto solubles como asociados a la membrana, o fragmentos funcionales de los mismos.

### **Anticuerpos anti-Flt-1**

**[0102]** Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos anti-Flt-1" se refiere a cualquier anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a un receptor Flt-1 (p. ej., receptor Flt-1 soluble o asociado

a la membrana). En algunas formas de realización, se producen anticuerpos anti-Flt-1 que se unen con alta afinidad a los receptores de Flt-1. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que el anticuerpo anti-Flt-1 que se une a los receptores Flt-1 inhibe la unión de uno o más ligandos endógenos a Flt-1 y, por lo tanto, permite una mayor cantidad de ligando para asociarse con otros receptores de VEGF, como el receptor Flk-1. La mayor disponibilidad de VEGF promueve la angiogénesis con un mayor flujo sanguíneo al músculo para combatir la isquemia funcional y conducir a mejoras en las características estructurales y funcionales de la DMD. En algunas formas de realización, la unión de anticuerpos a los receptores Flt-1 aumenta la cantidad de VEGF disponible para unirse a otros receptores de VEGF.

**[0103] La Tabla 2** describe anticuerpos anti-Flt-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos anti-Flt-1 o sus fragmentos de unión a antígeno de la invención se enumeran en las reivindicaciones.

Tabla 2.

Región variable de cadena pesada	CDR1	CDR2	CDR3
IGHV3-23*01	SYAMS (SEQ ID NO: 1)	AISGSGSTYY ADSVKG (SEQ ID NO: 5)	DY (SEQ ID NO: 15)
IGHV3-23*04	SYAMS (SEQ ID NO: 1)	AISGSGSTYY ADSVKG (SEQ ID NO: 5)	DY (SEQ ID NO: 15)
13B4_VH	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	AISWNGDSTYY AESMKG (SEQ ID NO: 6)	SWATPIESLYYYG MDY (SEQ ID NO: 16)
27H4_VH(97.6_1.0	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	AISWNGDSTYY AESLKG (SEQ ID NO: 7)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
27H9_VH(97.5_1.1	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	SAKG AISWNGDSTYYAE (SEQ ID NO: 8)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
25D4_VH(97.0_0.9	DYSAS (SEQ ID NO: 3)	AISWNGDSTYY AESVKG (SEQ ID NO: 9)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
25G9_VH(97.0_0.9	DISMS SEQ ID NO: 2)	AITWSGDSTYY AESVKG (SEQ ID NO: 10)	SWATPIESLYYYGT DY (SEQ ID NO: 18)
25F11_VH(97.5_1.	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	SAKG AISWNGDSTYYAE (SEQ ID NO: 8)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
29E2_VH(96.3_1.1	DYSLS (SEQ ID NO: 4)	AISWNGDSTYY AESVKG (SEQ ID NO: 9)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
27G9_VH(96.3_1.3	DYSAS (SEQ ID NO: 3)	AISWNGDSTYY AESLKG (SEQ ID NO: 11)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
27H6_VH(97.5	DYSAS (SEQ ID NO: 3)	AISWNGDSTYY AESVKG (SEQ ID NO: 12)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
27H9_NG/QG	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	SAKG AISWQGDSTYYAE (SEQ ID NO: 13)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
27H9_NG/NA	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	AISWNADSTYYAE SAKG (SEQ ID NO: 14)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
27H9_NA_+_AAA	DISMAS (SEQ ID NO: 2)	AISWNADSTYYAE SAKG (SEQ ID NO: 14)	SWATPIES LYYGSDY (SEQ ID NO: 17)
Región variable de cadena ligera	CDR1	CDR2	CDR3
IGLV3-9*01	GGNIGSKNVH (SEQ ID NO: 19)	RDSNRPS (SEQ ID NO: 22)	QV W (SEQ ID NO: 25)
IGLV3-9*02	GGNILGYKSVH (SEQ ID NO: 20)	RDNNRPS (SEQ ID NO: 23)	QV W (SEQ ID NO: 25)

(Continuación)

Región variable de cadena ligera	CDR1	CDR2	CDR3
LC_21B3	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWDGSTQAIV (SEQ ID NO: 26)
VL_27H4	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWEDSTQAIV (SEQ ID NO: 27)
VL_27H9	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWDESTQAIV (SEQ ID NO: 28)
VL_25D4	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWAASTQAIV (SEQ ID NO: 29)
VL_25G9	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWDDSTQAIV (SEQ ID NO: 30)
VL_25F11	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWESTQAIV (SEQ ID NO: 31)
VL_29E2	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWDASTQAIV (SEQ ID NO: 32)
VL_27G9	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWEESTQAIV (SEQ ID NO: 33)
VL_27H6	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWDGSTQAIV (SEQ ID NO: 26)
VL_27H6(DA)	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWDASTQAIV (SEQ ID NO: 32)
VL_27H6 (EG)	GGNIGSQTAQ (SEQ ID NO: 21)	ANRRPS (SEQ ID NO: 24)	QVWEGSTQAIV (SEQ ID NO: 34)
Región variable de cadena pesada	VH		
IGHV3-23*01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGTYADSVKG RFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAK ----- -DY WQGTLTVSS (SEQ ID NO: 35)		
IGHV3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGTYADSVKG RFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAK ----- -DY WQGTLTVSS (SEQ ID NO: 36)		

(Continuación)

Región variable de cadena pesada	VH
13B4_VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKGLEWVS AISWNGDSTYYAESMKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYMDY WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:37)
27H4_VH(97.6_1.0	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKGLEWVS AISWNGDSTYYAESLKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:38)
27H9_VH(97.5_1.1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKGLEWVS AISWNGDSTYYAESAKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:39)
25D4_VH(97.0_0.9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSAS WVRQAPGKGLEWVS AISWNGDSTYYAESVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:40)
25G9_VH(97.0_0.9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKGLEWVS AITWSGDSTYYAESVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYTDY WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:41)
25F11_VH(97.5_1.	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKGLEWVS AISWNGDSTYYAESAKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:42)
29E2_VH(96.3_1.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSLS WVRQAPGKGLEWVS AISWNGDSTYYAESVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYGYSDY WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:43)

(Continuación)

Región variable de cadena pesada	VH
27G9_VH(96.3_1.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSAS WVRQAPGKLEWVS AISWQSDSTYYAESLKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYYGSDY WGQGTILVTSS (SEQ ID NO:44)
27H6_VH(97.5	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYSAS WVRQAPGKLEWVS AISWQSDSTYYAESVKG RFTIFRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYYGSDY WGQGTILVTSS (SEQ ID NO:45)
27H9_NG/QG	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKLEWVS AISWQSDSTYYAESAKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYYGSDY WGQGTILVTSS (SEQ ID NO:46)
27H9_NG/NA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKLEWVS AISWNADSTYYAESAKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYYGSDY WGQGTILVTSS (SEQ ID NO:47)
27H9_NA_+_AAA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR DYSMS WVRQAPGKLEWVS AISWNADSTYYAESAKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK SWATPIESLYYYGSDY WGQGTILVTSS (SEQ ID NO:48)
Región variable de cadena ligera	VL
IGLV3-9*01	SYELTQPLSVSVVALGQARITC GNNIGSKNVH WYQKPGQAPFLVIY RDSNRPS GIPERFSGNSGNTATLTISRAQAGDEADYYC QV/------VV FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:49)
IGLV3-9*02	SYELTQPLSVSVVALGQARITC GNNIGKYSVH WYQKPGQAPFLVIY RDNRPS GIPERFSGNSGNTATLTISRAQAGDEADYYC QV/------VV FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:50)

(Continuación)

Región variable de cadena ligera	VL
LC_21B3	SYELTQSPSVSVALRQTAKITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWWDGSTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 51)
VL_27H4	SYELTQPLSVSVALGQTARITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWWDSTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 52)
VL_27 H 9	SYELTQPLSVSVALRQTARITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWWDSTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 53)
VL_25D4	SYELTQPLSVSVALGQTARITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWPAASTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 54)
VL_25G9	SYELTQPLSVSVALRQAARITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWDDSTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 55)
VL_25F11	SYELTQPLSVSVALRQAARITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWWEASTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 56)
VL_29E2	SYELTQSPSVSVALRQTAKITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAGDEADYYC QWDASTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 57)
VL_27G9	SYELTQPLSVSVALGQTAKITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAEADYYC QWWEESTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 58)
VL_27 H 6	SYELTQPLSVSVALPQAARITC GGNIGSQTAQ WYQKPGQAPVLVIY ANRRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAGDEADYYC QWWDGSTQAIV FGGGTHLTVL (SEQ ID NO: 59)

(Continuación)

Región variable de cadena ligera	VL
VL_27H6(DA)	<p>SYELTQPLSVSVALRQAAKTC GGNIGSQTAQ WYQQKPGQAPVLVIY ANRRPS  GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAGDEADYYC QWDASTQAIV FGGGTKLTVL  (SEQ ID NO:60)</p>
VL_27H6 (EG)	<p>SYELTQPLSVSVALRQAAKTC GGNIGSQTAQ WYQQKPGQAPVLVIY ANRRPS  GIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQAGDEADYYC QWEGSTQAIV FGGGTKLTVL  (SEQ ID NO:61)</p>
Cadena pesada	<p><b>Secuencia de cadena pesada (VH+CH1/2/3)</b></p>
VH_27H6_DG/EG	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSASVVRQAPGKGLVWVAISWSGDSTTYAESV  KGRFTI FRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYCAKSWATPIESLYYYGSDYWGQGTFLVTVSSAST  KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHCTCPAPELGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAAKTRPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNKGEYKCKVSNKALPAPI EKTISRAKGPQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKS  LSLSPGK  (SEQ ID NO:62)</p>
VH_2 7H6_DG/DA	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSASVVRQAPGKGLVWVAISWSGDSTTYAESV  KGRFTI FRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYCAKSWATPIESLYYYGSDYWGQGTFLVTVSSAST  KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHCTCPAPELGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAAKTRPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNKGEYKCKVSNKALPAPI EKTISRAKGPQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKS  LSLSPGK  (SEQ ID NO:63)</p>



Cadena pesada	Secuencia de cadena pesada (VH+CH1/2/3) (Continuación)
VH_27H9_NG/QG	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSAISWQGDSTYYAESAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYIGSDYWGQGTLLTVYSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHCTCPAPPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVAFNMYVDGVEVHNANKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVKNKALPAPIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO: 64)</p>
VH_27H9_NG/NA	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSAISWADSTYYAESAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYIGSDYWGQGTLLTVYSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHCTCPAPPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVAFNMYVDGVEVHNANKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVKNKALPAPIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO: 65)</p>
VH_27H4_NG/QG	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSAISWQGDSTYYAESLKGRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYIGSDYWGQGTLLTVYSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHCTCPAPPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVAFNMYVDGVEVHNANKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVKNKALPAPIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(SEQ ID NO: 66)</p>

Cadena pesada	Secuencia de cadena pesada (VH+CH1/2/3) (Continuación)
VH_27H4_NG/NA	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSALSWNADSTYYAESL            KGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYGGSDYWGQGLTVTVSSAST            KGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS            VVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKVEPKSCDKHTCTCPCPAPEAGAPSVFLFPKPK            DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTRPREEQNSTYRVVSVLTVLHQD            WLNKREYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPOVYITLPISRDELTKNOVSLTCLVKGFPYPSD            IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS            LSLSFGK            (SEQ ID NO: 67)</p>
VH_27H4_NA_+ AA	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSALSWNADSTYYAESL            KGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYGGSDYWGQGLTVTVSSAST            KGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS            VVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKVEPKSCDKHTCTCPCPAPEAGAPSVFLFPKPK            DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTRPREEQNSTYRVVSVLTVLHQD            WLNKREYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPOVYITLPISRDELTKNOVSLTCLVKGFPYPSD            IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS            LSLSFGK            (SEQ ID NO: 68)</p>
VH_27H9_NA_+ AA	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSALSWNADSTYYAESL            KGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYGGSDYWGQGLTVTVSSAST            KGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS            VVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKVEPKSCDKHTCTCPCPAPEAGAPSVFLFPKPK            DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTRPREEQNSTYRVVSVLTVLHQD            WLNKREYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPOVYITLPISRDELTKNOVSLTCLVKGFPYPSD            IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS            LSLSFGK            (SEQ ID NO: 69)</p>

Cadena pesada	Secuencia de cadena pesada (VH+CH1/2/3) (Continuación)
VH_21B 3_AAA	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSALSWNGDSTYYAESL            KGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYGGDYWGQGTLLTVSSAST            KGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLSS            VVTVFSSSLGTQTYICNVNKKFSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPCPAPEAAGAPSVFLFPKPK            DTLMIKSTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTRPREEQYNSTYRVSVLTCLVKGFYPSD            WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD            IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS            LSLSPGK            (SEQ ID NO: 70)</p>
VH_27H6	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSALSWNGDSTYYAESV            KGRFTIFRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYGGDYWGQGTLLTVSSAST            KGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLSS            VVTVFSSSLGTQTYICNVNKKFSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK            DTLMIKSTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTRPREEQYNSTYRVSVLTCLVKGFYPSD            WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD            IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS            LSLSPGK            (SEQ ID NO: 71)</p>
VH_27H4	<p>ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSALSWNGDSTYYAESL            KGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYGGDYWGQGTLLTVSSAST            KGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLSS            VVTVFSSSLGTQTYICNVNKKFSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK            DTLMIKSTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTRPREEQYNSTYRVSVLTCLVKGFYPSD            WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD            IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS            LSLSPGK            (SEQ ID NO: 72)</p>

<div> <div>Cadena pesada</div> <div>Secuencia de cadena pesada (VH+CH1/2/3)</div> <div>(Continuación)</div> </div>	
VH_27H9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSAISWNGDSTYYAESAKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLRPAEDTAVYYCAKSWATPIESLYYIGSDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMNEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
HC_13B4	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWVRQAPGKGLEWVSAISWNGDSTYYAESMKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLRSEDTAVYYCAKSWATPIESLYYIGMDYWGKGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKSYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMNEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
<div> <div>Cadena ligera</div> <div>Secuencia de cadena ligera (VL+CL)</div> </div>	
LC_27H6_DG/EG	SYELTQPLSVSVVALRQAAKITCGGNNIGSQTAQWYQOKPGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQGEADYYCQVWEGSTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWRADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTLTPQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 75)
LC_27H6_DG/DA	SYELTQPLSVSVVALRQAAKITCGGNNIGSQTAQWYQOKPGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRQAQGEADYYCQVWWDASTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWRADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTLTPQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 76)

Cadena ligera	Secuencia de cadena ligera (VL+CL) (Continuación)
LC_27H9_NG/QG	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKFGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQWDESDTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 77)
LC 27H9 NG/NA	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKFGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQWDESDTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 78)
LC_2 7H4_NG/QG	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKFGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQWDESDTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 79)
LC_27H4_NG/NA	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKFGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQWDESDTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 80)
LC_27H4_NA_+_A AA	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKFGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQWDESDTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 81)
LC_27H9_NA_+_A AA	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKFGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQWDESDTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 82)

Cadena ligera	Secuencia de cadena ligera (VL+CL) (Continuación)
LC_21B3_AAA	SYELTQSPSVVALRQTAKITCGGNNIGSQTAWYQQKPGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQVMDGSTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYFGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 83)
LC_27H6	SYELTQPLSVSVALRQAAKITCGGNNIGSQTAWYQQKPGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQVMDGSTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYFGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 84)
LC_27H4	SYELTQPLSVSVALRQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKPGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQVMDGSTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYFGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 85)
LC_27H9	SYELTQPLSVSVALRQTARITCGGNNIGSQTAWYQQKPGQAPVLVIYANNRRPSGIPERFSGS KSGNTATLTISRQAQAEADYYCQVMDGSTQAIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYFGAVTVAMKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 86)
Región constante	CH1-CH2-CH3
27H6_DG/EG	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGLCLYNDYFPEPVTVMNSGALTSQVHTFPFVAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHRFNSKTRVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELGGPSVFLFPP KPDITLMISITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNANKTRFEEQYNSTYRVVSYLTVL HQDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEINTISNKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLIVNGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVNHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)

Región constante	CH1-CH2-CH3 (Continuación)
27H6_DG/DA	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVQDYFFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQYNSTYRVWSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)</p>
27H9_NG/QG	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVQDYFFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQYNSTYRVWSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)</p>
27H9_NG/NA	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVQDYFFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQYNSTYRVWSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)</p>
27H4_NG/QG	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVQDYFFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQYNSTYRVWSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)</p>
27H4_NG/NA	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVQDYFFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQYNSTYRVWSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)</p>

Región constante	CH1-CH2-CH3 (Continuación)
27H4_NA_+AAA	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPEAAGAPSVFLFPP RKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)
27H9_NA_+AAA	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPEAAGAPSVFLFPP RKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)
21B3_AAA	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPEAAGAPSVFLFPP RKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)
27H6	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELGGPSVFLFPP RKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)
27H4	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP RKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)



Región constante		CH1-CH2-CH3	(Continuación)
27H9		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQINSYRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLIVKGFY PSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSMVEALHHHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)	
13B4		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQINSYRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLIVKGFY PSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSMVEALHHHT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:89)	

**[0104]** En una forma de realización particular, la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 87 a SEQ ID NO: 89.

**[0105]** En otra forma de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 76, 83, 84, 85 y 86, y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 70, 71, 72 o 73. En una forma de realización particular, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

**[0106]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a Flt-1 humano con una afinidad superior a aproximadamente  $10^{-7}$  M, superior a aproximadamente  $0,5 \times 10^{-7}$ , superior a aproximadamente  $10^{-8}$  mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-8}$  mayor que aproximadamente  $10^{-9}$  M, mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-9}$  mayor que aproximadamente  $10^{-10}$  M, mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-10}$  M, mayor que aproximadamente  $10^{-11}$  M, mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-11}$  M, mayor que aproximadamente  $10^{-12}$  M, o mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-12}$  M. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a Flt-1 de ratón con una afinidad superior a aproximadamente  $10^{-7}$  M, superior a aproximadamente  $0,5 \times 10^{-7}$ , superior a aproximadamente  $10^{-8}$  superior a aproximadamente  $0,5 \times 10^{-8}$  superior a aproximadamente  $10^{-9}$  M, mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-9}$  mayor que aproximadamente  $10^{-10}$  M, mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-10}$  M, mayor que aproximadamente  $10^{-11}$  M, mayor que aproximadamente  $0,5 \times 10^{-11}$  M, mayor de aproximadamente  $10^{-12}$  M, o superior a aproximadamente  $0,5 \times 10^{-12}$  M. La afinidad del anticuerpo Flt-1 puede medirse, por ejemplo, en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, tal como un ensayo BIACORE.

**[0107]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por una  $CI_{50}$  por debajo de aproximadamente 500 pM, por debajo de aproximadamente 400 pM, por debajo de aproximadamente 300 pM, por debajo de aproximadamente 200 pM, por debajo de aproximadamente 100 pM, por debajo de aproximadamente 50 pM, por debajo de aproximadamente 25 pM, por debajo de aproximadamente 10 pM, por debajo de aproximadamente 5 pM o por debajo de aproximadamente 1 pM en un ensayo competitivo con Flt-1 humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por una  $CI_{50}$  por debajo de aproximadamente 500 pM, por debajo de aproximadamente 400 pM, por debajo de aproximadamente 300 pM, por debajo de aproximadamente 200 pM, por debajo de aproximadamente 100 pM, por debajo de aproximadamente 50 pM, por debajo de aproximadamente 25 pM, por debajo de aproximadamente 10 pM, por debajo de aproximadamente 5 pM o por debajo de aproximadamente 1 pM en un ensayo de competición con Flt-1 de ratón.

**[0108]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, inhibe la unión y/o la actividad de VEGF en el receptor Flt-1. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por una  $CI_{50}$  por debajo de aproximadamente 500 pM, por debajo de aproximadamente 400 pM, por debajo de aproximadamente 300 pM, por debajo de aproximadamente 200 pM, por debajo de aproximadamente 100 pM, por debajo de aproximadamente 50 pM, por debajo de aproximadamente 25 pM, por debajo de aproximadamente 10 pM, por debajo de aproximadamente 5 pM o por debajo de aproximadamente 1 pM para la inhibición de la unión de VEGF a Flt-1 humano en un ensayo de competición.

**[0109]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se completa con y/o inhibe la unión de VEGF a Flt-1 soluble. En otras formas de realización, la competencia y/o la inhibición son de una manera dependiente de la dosis. En formas de realización particulares, la inhibición de la unión de VEGF a Flt-1 da como resultado un aumento de la fosforilación de VEGF R2. Sin pretender ceñirse a ninguna teoría, la unión del anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, a Flt-1 inhibe la unión de VEGF a Flt-1. El VEGF no unido se une a VEGF R2, lo que puede demostrarse midiendo la fosforilación de VEGF R2. En formas de realización particulares, el anticuerpo anti-Flt-1 o el fragmento de unión a antígeno rescata la fosforilación de VEGF R2 de una manera dependiente de la dosis. Por ejemplo, la fosforilación de VEGF R2 puede recuperarse en al menos un 100 %, un 95 %, un 90 %, un 85 %, un 80 %, un 75 %, un 70 %, un 65 %, un 60 %, un 55 %, alrededor del 50 %, alrededor del 45 %, alrededor del 40 %, alrededor del 35 %, alrededor del 30 %, alrededor del 25 %, alrededor del 20 %, alrededor del 15 %, alrededor del 10 % o alrededor del 5 %.

**[0110]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo proporciona más del 95 %, más del 90 %, más del 85 %, más del 80 %, más del 75 %, superior al 70 %, superior al 65 %, superior al 60 %, superior al 55 %, superior al 50 %, superior al 45 %, superior al 40 %, superior al 35 %, mayor que aproximadamente el 30 %, mayor que aproximadamente el 25 %, mayor que aproximadamente el 20 %, mayor que aproximadamente el 15 % o mayor que aproximadamente el 10 % de rescate en un bioensayo. En una forma de realización particular, el bioensayo comprende células endoteliales de vena primaria humana (HUVEC) estimuladas con VEGF en presencia de sFlt-1 y el anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. La activación de células inducida por VEGF puede ensayarse determinando el estado de fosforilación del receptor VEGF R2. Los

datos pueden expresarse como porcentaje de rescate de la fosforilación del receptor VEGF R2 en relación con la fosforilación del receptor VEGF R2 en presencia de sFlt-1 solo (p. ej., sin anticuerpos anti-Flt-1).

**[0111]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una vida media superior a aproximadamente 200 horas, superior a aproximadamente 150 horas, superior a aproximadamente 100 horas, superior a aproximadamente 95 horas, superior que aproximadamente 90 horas, superior que aproximadamente 85 horas, superior que aproximadamente 80 horas, superior que aproximadamente 75 horas, superior que aproximadamente 70 horas, superior que aproximadamente 65 horas, superior que aproximadamente 60 horas, superior que aproximadamente 55 horas, superior de aproximadamente 50 horas o superior de aproximadamente 45 horas, y los intervalos de los mismos. En algunas formas de realización, la vida media se mide en un ratón.

**[0112]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una concentración sérica máxima superior a 400 ug/ml, superior a 375 ug/ml, superior a 350 ug/ml, superior a 325 ug/ml, mayor que aproximadamente 300 ug/ml, mayor que aproximadamente 275 ug/ml, mayor que aproximadamente 250 ug/ml, mayor que aproximadamente 225 ug/ml, mayor que aproximadamente 200 ug/ml, mayor que aproximadamente 175 ug/ml, mayor que aproximadamente 150 ug/ml, mayor que aproximadamente 125 ug/ml, mayor que aproximadamente 100 ug/ml, mayor que aproximadamente 75 ug/ml o mayor que aproximadamente 50 ug/ml, y los intervalos de los mismos. En algunas formas de realización, la concentración sérica máxima se mide en un ratón.

**[0113]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une selectivamente a Flt-1 y tiene una unión mínima o no apreciable a otros receptores de VEGF. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une selectivamente a Flt-1 y tiene una unión mínima o no apreciable a VEGF R2 (Flk-1) y/o VEGF R3 (Flt-4).

**[0114]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una  $k_a$  mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , o mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  cuando se une a Flt-1 humana.

**[0115]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un  $K_D$  mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$  o mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$  cuando se une a Flt-1 humana.

**[0116]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una  $K_D$  mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ , mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ , superior a aproximadamente  $1 \times 10^{-11} \text{ M}$  o superior a aproximadamente  $1 \times 10^{-12} \text{ M}$  cuando se une a Flt-1 humana.

**[0117]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a Flt-1 soluble. En formas de realización particulares, la unión depende de la dosis en la que concentraciones más altas de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se unen a mayores cantidades de Flt-1 soluble.

**[0118]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un porcentaje de identidad humana superior al 99 %, superior al 98 %, superior al 97 %, superior al 96 %, superior al 95 %, superior al 94 %, superior al 93 %, superior al 92 %, superior al 91 %, superior al 90 % o superior al 80 %.

**[0119]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un porcentaje de homología humana superior al 99 %, superior al 98 %, superior al 97 %, superior al 96 %, superior al 95 %, superior al 94 %, superior al 93 %, superior al 92 %, superior al 91 %, superior al 90 % o superior al 80 %.

**[0120]** El anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a la proteína Flt-1. En alguna forma de realización, la proteína Flt-1 es una proteína recombinante, por ejemplo, sFlt-1 recombinante. En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a la isoforma 1 de Flt-1 humana (NP\_002010.2 GI:156104876; SEQ ID NO:90) (**Tabla 13**). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a la isoforma X1 de Flt-1 humana (XP\_011533316.1 GI:767977511; SEQ ID NO:91). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une al precursor de la isoforma 2 de Flt-1 humana (NP\_001153392.1 GI:229892220; SEQ ID NO:92). En otra forma de realización más, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une al precursor de la isoforma 3 de Flt-1 humana (NP\_001153502.1 GI:229892300; SEQ ID NO:93). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une al precursor de la isoforma 4 de Flt-1 humana (NP\_001153503.1 GI:229892302; SEQ ID NO:94).

**[0121]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a un epítipo a particular de la proteína Flt-1. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Flt-1 o la porción de unión a antígeno del mismo

se une a secuencias de aminoácidos como se proporciona en la **Tabla 3**.

Tabla 3.

posición de aminoácido basada en SEQ ID NO:90	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
141-153	EIPEIIHMTEGRE	SEQ ID NO: 95
193-206	IISNATYKEIGLLT	SEQ ID NO: 96
130-138	DTGRPFVEM	SEQ ID NO: 97
141-148	EIPEIIHM	SEQ ID NO: 98
139-148	YSEIPEIIHM	SEQ ID NO: 99
139-153	YSEIPEIIHMTEGRE	SEQ ID NO: 100
178-206	IPDGKRIIWDsrKGFIIISNATYKEIGLLT	SEQ ID NO: 101
199-204	YKEIGL	SEQ ID NO: 102
128-138	ISDTGRPFVEM	SEQ ID NO: 103

**[0122]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento del mismo que se une al antígeno *in vivo*, da como resultado niveles máximos de anticuerpos en suero de al menos al menos alrededor de 700 ug/mL, al menos alrededor de 650 ug/mL, al menos alrededor de 600 ug/mL, al menos alrededor de 550 ug/mL, al menos alrededor de 500 ug/mL, al menos alrededor de 450 ug/mL, al menos alrededor de 400 ug/mL, al menos alrededor de 350 ug/mL, al menos alrededor de 300 ug/mL, al menos alrededor de 250 ug/mL, al menos alrededor de 200 ug/mL, al menos alrededor de 150 ug/mL, al menos alrededor de 100 ug/mL, al menos alrededor de 50 ug/mL, al menos alrededor de 40 ug/mL, al menos alrededor de 30 ug/mL, al menos alrededor de 20 ug/mL, al menos alrededor de 10 ug/mL o al menos alrededor de 5 ug/mL, y rangos en el mismo. En algunas formas de realización, el nivel máximo de anticuerpos en suero depende de la dosis.

**[0123]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo *in vivo* da como resultado niveles mínimos de anticuerpos en suero de al menos alrededor de 450 ug/mL, al menos alrededor de 400 ug/mL, al menos alrededor de 350 ug/mL, al menos alrededor de 300 ug/mL, al menos alrededor de 250 ug/mL, al menos alrededor de 200 ug/mL, al menos alrededor de 150 ug/mL, al menos alrededor de 100 ug/mL, al menos alrededor de 50 ug/mL o al menos alrededor de 25 ug/mL, y los rangos de los mismos. En algunas formas de realización, el nivel mínimo de anticuerpos en suero depende de la dosis.

**[0124]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo *in vivo*, da como resultado una disminución del nivel sérico de Flt-1 soluble en comparación con un nivel de referencia o en comparación con un nivel en sujetos vehículo administrado solo. Por lo general, el nivel de referencia se mide inmediatamente antes de la administración. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo da como resultado una disminución del nivel sérico de Flt-1 soluble en al menos aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 20 % o aproximadamente un 10 % en comparación con el nivel basal en suero de Flt-1 soluble inmediatamente antes de la administración. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, da como resultado una disminución del nivel sérico de Flt-1 soluble a menos de alrededor de 4000 pg/mL, alrededor de 3500 pg/mL, alrededor de 3000 pg/mL, alrededor de 2500 pg/mL, alrededor de 2000 pg/mL, alrededor de 1750 pg/mL, alrededor de 1500 pg/mL, alrededor de 1250 pg/mL, alrededor de 1000 pg/mL, alrededor de 900 pg/mL, alrededor de 800 pg/mL, alrededor de 700 pg/mL, alrededor de 600 pg/mL, alrededor de 500 pg/mL, alrededor de 450 pg/mL, alrededor de 400 pg/mL, alrededor de 350 pg/mL, alrededor de 300 pg/mL, alrededor de 250 pg/mL, alrededor de 200 pg/mL, alrededor de 150 pg/mL, alrededor de 100 pg/mL, alrededor de 50 pg/mL o alrededor de 10 pg/mL, y los rangos de los mismos. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, da como resultado una disminución del nivel sérico de Flt-1 soluble en comparación con el nivel sérico de Flt-1 soluble en un sujeto al que no se le administra el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, la disminución del nivel sérico de Flt-1 soluble depende de la dosis.

**[0125]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo *in vivo* da como resultado un aumento del nivel sérico de VEGF en comparación con un nivel de referencia o en comparación con un nivel en sujetos tratados con vehículo solo. Por lo general, el nivel de referencia se mide inmediatamente antes del tratamiento. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo da como resultado un aumento del nivel sérico de VEGF en al menos aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 20 % o aproximadamente un 10 % en comparación con el nivel basal de VEGF en suero inmediatamente antes de la administración. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, da como resultado un aumento del nivel sérico de VEGF a más de aproximadamente 500 pg/ml, aproximadamente 450 pg/ml, aproximadamente 400 pg/ml, aproximadamente 350 pg/ml,

aproximadamente 300 pg/ml, aproximadamente 250 pg/ml, aproximadamente 200 pg/ml, aproximadamente 150 pg/ml, aproximadamente 100 pg/ml, aproximadamente 50 pg/ml o aproximadamente 25 pg/ml y rangos dentro de los mismos. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, da como resultado un aumento del nivel sérico de VEGF en comparación con el nivel sérico de VEGF en un sujeto que no recibe tratamiento. En algunas formas de realización, el aumento del nivel sérico de VEGF depende de la dosis.

**[0126]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento del mismo que se une al antígeno *in vivo* da como resultado un aumento de la angiogénesis en el tejido muscular. En algunas formas de realización, el músculo es músculo esquelético. En formas de realización particulares, el músculo es el músculo del diafragma, el músculo gastrocnemio y/o el músculo tibial anterior (TA). En algunas formas de realización, el aumento de la angiogénesis se demuestra mediante el aumento de la tinción con CD31 de un marcador de células endoteliales, por ejemplo, CD31. En algunas formas de realización, el aumento de la tinción se puede medir, por ejemplo, midiendo el porcentaje de área positiva para CD31 en el músculo de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, el porcentaje de área positiva para CD31 en el músculo del diafragma de los ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión al antígeno, puede ser de al menos alrededor del 0,5 %, alrededor del 0,6 %, alrededor del 0,7 %, alrededor del 0,8 %, alrededor del 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,1 %, alrededor del 2,2 %, alrededor del 2,3 %, alrededor del 2,4 % o alrededor del 2,5 % del área total del tejido. En otro ejemplo, el porcentaje de área positiva para CD31 en el músculo TA de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede ser de al menos aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 % o aproximadamente 1,0 % pf del área total del tejido. En una forma de realización particular, el porcentaje de área positiva para CD31 en el músculo del diafragma o el músculo TA de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1 puede ser significativamente mayor que el porcentaje de área positiva para CD31 en el músculo del diafragma o el músculo TA de los ratones a los que se les administró un anticuerpo de control de isotipo.

**[0127]** En algunas formas de realización, la tinción aumentada de un marcador de células endoteliales puede medirse, por ejemplo, midiendo el porcentaje de positividad CD31 normalizado en el músculo de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo. En formas de realización particulares, el aumento de la tinción de CD31 en el músculo de los ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión al antígeno, es relativo a la tinción de CD31 medida en el músculo de los ratones a los que se les administró un anticuerpo de control de isotipo. Por ejemplo, el porcentaje normalizado de positividad para CD31 en el músculo del diafragma de ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión al antígeno, puede ser al menos aproximadamente 200 %, aproximadamente 190 %, aproximadamente 180 %, aproximadamente 170 %, aproximadamente 160 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 140 %, aproximadamente 130 %, aproximadamente 120 % o aproximadamente 110 %. En otro ejemplo, el porcentaje de positividad normalizado para CD31 en el músculo TA de los ratones a los que se les administró el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión al antígeno, puede ser de al menos alrededor del 300 %, alrededor del 290 %, alrededor del 280 %, alrededor del 270 %, aproximadamente 260 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 240 %, aproximadamente 230 %, aproximadamente 220 %, aproximadamente 210 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 190 %, aproximadamente 180 %, aproximadamente 170 %, aproximadamente 160 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 140 %, aproximadamente 130 %, aproximadamente 120 % o aproximadamente 110 %, y los rangos de los mismos.

**[0128]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une selectivamente a Flt-1 humano, y tiene una unión mínima o no apreciable a otros receptores Flt-1 de mamíferos (p. ej., con una afinidad de unión menor de  $10^{-7}$  M o  $10^{-6}$  M). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une selectivamente a Flt-1 humano y no se une a Flt-1 de mono. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une selectivamente a Flt-1 humano y no se une a Flt-1 de ratón.

**[0129]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a Flt-1 humano así como a Flt-1 de mono. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a Flt-1 de cynomolgus. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se une a Flt-1 humano así como a Flt-1 de ratón.

**[0130]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste en IgG, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFvs, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

**[0131]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, es IgG. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, es IgG1.

Regiones constantes modificadas

**[0132]** En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-Flt-1 adecuado contiene un dominio Fc o una porción del mismo que se une al receptor FcRn. Como ejemplo no limitativo, un dominio Fc adecuado puede derivar de una subclase de inmunoglobulina tal como IgG. En algunas formas de realización, un dominio Fc adecuado se deriva de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los dominios Fc particularmente adecuados incluyen los derivados de anticuerpos humanos o humanizados.

**[0133]** Se contempla que la unión mejorada entre el dominio Fc y el receptor FcRn da como resultado una semivida sérica prolongada. Por lo tanto, en algunas formas de realización, un dominio Fc adecuado (SEQ ID NO: 104) comprende una o más mutaciones de aminoácidos que conducen a una unión mejorada a FcRn. Se conocen en la técnica varias mutaciones dentro del dominio Fc que mejoran la unión a FcRn y se pueden adaptar para poner en práctica la presente invención. En algunas formas de realización, un dominio Fc adecuado comprende una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Leu 234, Leu 235, Gly 237, Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 y/o Asn 434 de IgG1 humana.

**[0134]** Algunas mutaciones en el dominio Fc conducen a una unión reducida de la IgG con el receptor FcRn y, por lo tanto, inhiben la función efectora. En algunas formas de realización, un dominio Fc adecuado (SEQ ID NO: 104) comprende una o más mutaciones en una o más posiciones correspondientes a Leu 234, Leu 235 y Gly 237 de IgG1 humana. En una forma de realización particular, Leu 234 está mutado a Ala. En otra forma de realización, Leu 235 está mutado a Ala. En otra forma de realización, Gly 237 está mutado a Ala.

**[0135]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-FLT-1 o el fragmento de unión de antígeno contiene un espaciador y/o está vinculado a otra entidad. En algunas formas de realización, el enlazador o espaciador comprende una secuencia de al menos el 50 % (por ejemplo, al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO:105) (enlazador GAG). En algunas formas de realización, el enlazador o espaciador comprende una secuencia de al menos el 50 % (por ejemplo, al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO:106) (enlazador GAG2). En algunas formas de realización, el enlazador o espaciador comprende una secuencia de al menos el 50 % (por ejemplo, al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 107) (enlazador GAG3).

**Producción de anticuerpos anti-Flt-1 y fragmentos de unión a antígeno**

**[0136]** Un anticuerpo anti-Flt-1 recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede producirse por cualquier medio disponible. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno se puede producir de forma recombinante utilizando un sistema de células huésped diseñado para expresar un anticuerpo recombinante anti-Flt-1 o un ácido nucleico que codifica un fragmento de unión a antígeno.

**[0137]** Por lo tanto, el anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede codificarse mediante secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento. Puede usarse una secuencia de polinucleótidos para codificar una secuencia de aminoácidos de cadena pesada o de cadena ligera de un anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Se puede usar una secuencia de polinucleótidos para codificar una región variable de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada o de cadena ligera de un anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

**[0138]** Una secuencia de polinucleótidos puede incluir además una secuencia que codifica un péptido señal. Un péptido señal adecuado incluye la secuencia de aminoácidos MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 111).

**[0139]** Varias secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento pueden incorporarse en varios sistemas de vectores para la expresión de anticuerpos anti-Flt-1 recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención.

**[0140]** Cuando los anticuerpos de la presente invención se producen de forma recombinante, se puede usar cualquier sistema de expresión. Para dar unos pocos ejemplos, los sistemas de expresión conocidos incluyen, por ejemplo, células de huevo, baculovirus, plantas, levaduras o mamíferos.

**[0141]** En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-Flt-1 recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede producirse en células de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); y línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651).

**[0142]** En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-Flt-1 recombinante o un fragmento de unión a antígeno

del mismo de la presente invención se puede producir a partir de células humanas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-Flt-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede producirse a partir de células CHO.

## 5 **Composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos de la invención**

**[0143]** La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-Flt-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la invención, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales.

**[0144]** Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento están dirigidas principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, el experto en la materia entenderá que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todo tipo. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a varios animales es bien conocida, y el farmacólogo veterinario con experiencia ordinaria puede diseñar y/o realizar dicha modificación con experimentación meramente ordinaria, si es que la hay.

**[0145]** Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos de preparación incluyen el paso de asociar el ingrediente activo con un diluyente u otro excipiente o vehículo y/o uno o más ingredientes accesorios y luego, si es necesario y/o deseable, moldear y/o envasar el producto en una unidad monodosis o multidosis deseada.

**[0146]** Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede preparar, envasar y/o vender a granel, como una sola dosis unitaria y/o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosis del ingrediente activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosis como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

**[0147]** Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y dependiendo además de la vía por la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre 0,1 % y 100 % (p/p) de ingrediente activo.

**[0148]** Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en este documento, incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, espesantes o agentes emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, AR Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; como referencia) describe varios excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en la medida en que cualquier medio o vehículo excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, por ejemplo, al producir algún efecto biológico indeseable o al interactuar de otra manera de manera nociva con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, puede usarse.

**[0149]** En algunas formas de realización, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable tiene una pureza de al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %. En algunas formas de realización, un excipiente o vehículo está aprobado para uso en humanos y para uso veterinario. En algunas formas de realización, un excipiente o vehículo está aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. En algunas formas de realización, un excipiente o vehículo es de calidad farmacéutica. En algunas formas de realización, un excipiente o vehículo cumple con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

**[0150]** Excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a diluyentes inertes, agentes dispersantes y/o granulares, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes amortiguadores, agentes lubricantes y/o aceites. Dichos excipientes o vehículos pueden incluirse opcionalmente en formulaciones farmacéuticas. Los excipientes o vehículos tales como manteca de cacao y ceras para ovulos, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y/o agentes perfumantes pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

**[0151]** Los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, entre otros, agua, soluciones salinas (p. ej., NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábiga, aceites

vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos como lactosa, amilosa o almidón, azúcares como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Si se desea, las preparaciones farmacéuticas pueden mezclarse con agentes auxiliares (p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares) que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos o interferir con su actividad. En una forma de realización preferida, se usa un vehículo soluble en agua adecuado para la administración intravenosa.

**[0152]** Una composición farmacéutica o medicamento adecuado, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Una composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, tableta, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. Una composición también se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinil pirrolidona, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

**[0153]** Una composición farmacéutica o medicamento puede formularse de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una composición para administración intravenosa normalmente es una solución en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o un sobre, que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se mezclen antes de la administración.

**[0154]** Las consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (para referencia).

#### **Vías de administración**

**[0155]** Un anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención (o una composición que contiene un anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención) se administra por cualquier vía apropiada. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o la proteína del fragmento de unión al antígeno o una composición farmacéutica que los contiene se administra por vía parenteral. La administración parenteral puede ser administración intravenosa, intradérmica, intratecal, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, intramuscular, subcutánea, intramuscular y/o transmucosa. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o su fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica que lo contiene se administra por vía subcutánea. Como se usa en este documento, el término "tejido subcutáneo" se define como una capa de tejido conectivo irregular suelto inmediatamente debajo de la piel. Por ejemplo, la administración subcutánea se puede realizar inyectando una composición en áreas que incluyen, entre otras, la región del muslo, la región abdominal, la región de los glúteos o la región de la escápula. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o su fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica que lo contiene se administra por vía intravenosa. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o su fragmento de unión a antígeno o una composición farmacéutica que lo contiene se administra por vía oral. Si se desea, se puede utilizar más de una ruta al mismo tiempo.

**[0156]** En algunas formas de realización, la administración da como resultado solo un efecto localizado en un individuo, mientras que en otras formas de realización, la administración da como resultado efectos en múltiples partes de un individuo, por ejemplo, efectos sistémicos. Por lo general, la administración da como resultado la entrega del anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión al antígeno a uno o más tejidos objetivo, incluidos, entre otros, riñón, hígado, cerebro, médula espinal, tracto intestinal, ojo, pulmón, bazo, corazón, incluyendo músculo cardíaco, músculo estriado y músculo liso.

**[0157]** En algunas formas de realización, el músculo estriado se selecciona del grupo que consta de tríceps, tibial anterior, sóleo, gastrocnemio, cuádriceps y diafragma.

**[0158]** En algunas formas de realización, el músculo liso son los músculos que revisten los vasos sanguíneos, los bronquiolos, la vejiga y el tracto gastrointestinal, como el recto.

#### **Formas de dosificación y régimen de dosificación**

**[0159]** En algunas formas de realización, una composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o



según un régimen de dosificación que se correlaciona con un resultado particular deseado (p. ej., con el tratamiento o la reducción del riesgo de una distrofia muscular, como la distrofia muscular de Duchenne).

**[0160]** Las dosis o cantidades particulares a administrar de acuerdo con la presente invención pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la naturaleza y/o el alcance del resultado deseado, de los detalles de la ruta y/o el momento de la administración, y/o de una o más características (p. ej., peso, edad, antecedentes personales, característica genética, parámetro de estilo de vida, gravedad del defecto cardíaco y/o nivel de riesgo de defecto cardíaco, etc., o combinaciones de los mismos). Tales dosis o cantidades pueden ser determinadas por los expertos en la materia. En algunas formas de realización, se determina una dosis o cantidad apropiada de acuerdo con técnicas clínicas estándar. Como alternativa o adicionalmente, en algunas formas de realización, una dosis o cantidad apropiada se determina mediante el uso de uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación o las cantidades deseables u óptimas a administrar.

**[0161]** En diversas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o su fragmento de unión a antígeno se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (p. ej., tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o condición subyacente). En algunas formas de realización particulares, las dosis o cantidades apropiadas a administrar pueden extrapolarse de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o *in vitro*.

**[0162]** En algunas formas de realización, una composición proporcionada se proporciona como una formulación farmacéutica. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica es o comprende una cantidad de dosis unitaria para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación correlacionado con el logro de la incidencia o el riesgo reducidos de una distrofia muscular, tal como la distrofia muscular de Duchenne.

**[0163]** En algunas formas de realización, una formulación que comprende el anticuerpo anti-Flt-1 o el fragmento de unión al antígeno se administra como una dosis única. En algunas formas de realización, se administra a intervalos regulares una formulación que comprende el anticuerpo anti-Flt-1 o el fragmento de unión al antígeno. La administración en un "intervalo", como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (a diferencia de una dosis única). El intervalo se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. En algunas formas de realización, una formulación que comprende el anticuerpo anti-Flt-1 o el fragmento de unión a antígeno se administra cada dos meses, dos veces al mes, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, un día, dos veces al día o cada seis horas. El intervalo de administración para un solo individuo no necesita ser un intervalo fijo, sino que puede variar con el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno, se administra dos veces por semana.

**[0164]** Como se usa en el presente documento, el término "bimestral" significa administración una vez cada dos meses (es decir, una vez cada dos meses); el término "mensual" significa administración una vez al mes; el término "trisemanalmente" significa administración una vez cada tres semanas (es decir, una vez cada tres semanas); el término "bisemanal" significa administración una vez cada dos semanas (es decir, una vez cada dos semanas); el término "semanal" significa administración una vez por semana; y el término "diario" significa administración una vez al día.

**[0165]** En algunas formas de realización, una formulación que comprende el anticuerpo anti-Flt-1 o el fragmento de unión a antígeno se administra a intervalos regulares de forma indefinida. En algunas formas de realización, se administra una formulación que comprende el anticuerpo anti-Flt-1 o el fragmento de unión a antígeno a intervalos regulares durante un período definido.

**[0166]** Como se describe en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina en gran medida en función de la cantidad total del agente terapéutico contenido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier composición particular, una cantidad terapéuticamente efectiva (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación efectivo) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración o de la combinación con otros agentes farmacéuticos.

**[0167]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra a una dosis que oscila entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg. En formas de realización particulares, el

anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra a una dosis de aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 3,0 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 20 mg/kg.

**[0168]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, reduce la intensidad, gravedad o frecuencia, o retrasa la aparición de al menos un signo o síntoma de DMD. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, reduce la intensidad, la gravedad o la frecuencia, o retrasa la aparición de al menos un signo o síntoma de DMD seleccionado del grupo que consiste en atrofia muscular, deformidad esquelética, miocardiopatía, isquemia muscular, deterioro cognitivo y deterioro de la función respiratoria.

**[0169]** En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-Flt-1, o su fragmento de unión a antígeno mejora el resultado clínico medido por una prueba de caminata de 6 minutos, prueba de fuerza muscular cuantitativa, prueba de rendimiento motor cronometrado. Escalas de función de las extremidades de Brooke y Vignos, prueba de función pulmonar (capacidad vital forzada, volumen espiratorio forzado en 1 segundo, tasa de flujo espiratorio máximo, presiones inspiratorias y espiratorias máximas), calidad de vida relacionada con la salud, flexores de rodilla y codo, extensores de codo, abducción de los hombros, fuerza de prensión, tiempo para levantarse desde la posición supina, evaluación ambulatoria de North Start, caminata/carrera cronometrada de 10 metros, escala Egen-Klassification, puntaje de Gowers, habilidad motora de Hammersmith, miometría manual, rango de movimiento, goniometría, hipercapnia, escalas de Nayley de Desarrollo de Bebés y Niños Pequeños, y/o una escala de carga del cuidador.

### ***Terapia combinada***

**[0170]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Flt-1 o su fragmento de unión a antígeno se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una forma de realización, el agente terapéutico adicional es un corticosteroide, por ejemplo, prednisona. En otra forma de realización, el agente terapéutico adicional es un glucocorticoide, por ejemplo, deflazacort. En otra forma de realización, el agente terapéutico adicional es folistatina o una proteína recombinante de la misma. En otra forma de realización, el agente terapéutico adicional es un agente terapéutico modulador de ARN. El agente terapéutico de modulación de ARN puede ser un agente terapéutico de omisión de exón o una terapia génica. El terapéutico modulador de ARN puede ser, por ejemplo, Drispersen, PRO044, PRO045, Eteplirsén (AVI-4658), SRP-4053, SRP-4045, SRP-4050, SRP-4044, SRP-4052, SRP-4055 o SRP-4008. En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional se usa actualmente para el tratamiento de una distrofia muscular. En otras formas de realización, el agente terapéutico adicional también puede usarse para tratar otras enfermedades o trastornos. En algunas formas de realización, el (los) agente(s) terapéutico(s) conocido(s) se administra(n) de acuerdo con su régimen y/o programa de dosificación estándar o aprobado. En algunas formas de realización, el (los) agente(s) terapéutico(s) conocido(s) se administra(n) de acuerdo con un régimen que se altera en comparación con su régimen y/o programa de dosificación estándar o aprobado. En algunas formas de realización, dicho régimen alterado difiere del régimen de dosificación estándar o aprobado en que una o más dosis unitarias se modifican (p. ej., se reducen o aumentan) en cantidad, y/o en que la dosificación se modifica en frecuencia (p. ej., en que se amplía uno o más intervalos entre dosis unitarias, lo que da como resultado una frecuencia más baja, o se reduce, lo que da como resultado una frecuencia más alta).

### **EJEMPLOS**

#### **Ejemplo 1. Generación y caracterización de anticuerpos anti-Flt-1 de alta afinidad**

##### Generación de anticuerpos

**[0171]** Se generaron anticuerpos monoclonales contra Flt-1 soluble utilizando la metodología de anticuerpos monoclonales de llama. Brevemente, se inmunizaron llamas con Flt-1 soluble humano recombinante (adquirido de ABCAM) y se recogió el suero.

##### Caracterización de anticuerpos

**[0172]** Los anticuerpos que se unen a Flt-1 humano y de ratón se caracterizaron adicionalmente para 1) la familia VH; 2) afinidad por Flt-1; 3) CI50; 4) cribado fuera de ritmo mediante ensayo Biacore, 5) reactividad cruzada con cynomolgus Flt-1 y 6) unión a VEGF R2 y VEGF R3. Los anticuerpos candidatos contra Flt-1 humano (hFlt-1) y Flt-1 de ratón (mFlt-1) se caracterizaron como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4.

Anticuerpo	Familia VH	Afinidad (nM)		CI50 por ELISA (pM)		Bioensayo (%) rescate)		Identidad humana (%)	
		hFlt-1	mFlt-1	hFlt-1	mFlt-1	hFlt-1	mFlt-1	VH	VL
<b>13B4</b>	15	0,6	1,4	13,3	500	>90	72,2	94,3	93,7
<b>10G12</b>	17	0,29	0,33	400	300	44	87,5	90,8	81
<b>11A11</b>	20	0,2		33,3		>90		90,8	91,1

**[0173]** Las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos 13B4 y 10G12 se estudiaron en ratones mediante la administración intravenosa de 10 mg/kg de cada anticuerpo (**Tabla 5**). Los datos demostraron que el anticuerpo 10G12 no se puede detectar más allá de las 288 horas, mientras que el anticuerpo 13B4 se puede detectar a las 672 horas (**Figuras 1A-1B**).

Tabla 5.

Anticuerpo	t <sub>1/2</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-último</sub> (h*ng/ml)	AUC <sub>0-inf</sub> (h*ng/ml)	CL (ml/h/kg)	R <sup>2</sup>
<b>13B4</b>	87,7	293675	1	31669464	31926743	0,31	0,960
<b>10G12</b>	99,3	359268	0,5	15999900	19120025	0,52	0,944

#### Eficacia in vivo de anticuerpos

**[0174]** Se trataron ratones *Mdx* (es decir, un modelo de ratón de distrofia muscular de Duchenne) con 20 mg/kg de anticuerpo 13B4 o anticuerpo 10G12 por administración intravenosa dos veces por semana durante un mes a partir de las 4 semanas de edad. Los ratones de control se trataron solo con vehículo, un anticuerpo de control de isotipo que no se une a Flt-1 o un anticuerpo comercial anti-Flt-1 conocido como antagonista de Flt-1:VEGF (Angio Proteomie, número de catálogo AP-MAB0702). Para evaluar la concentración de anticuerpos séricos en un punto mínimo de exposición, se recogió sangre 4 días después de la quinta dosis intravenosa. Para evaluar la concentración de anticuerpos séricos en un punto máximo de exposición, se recolectó sangre 24 horas después de la última dosis. Las concentraciones máxima y mínima de los anticuerpos 13B4 y 10G12 se muestran en las **Figuras 2A y 2B**. La concentración de anticuerpo libre 13B4 y anticuerpo libre 10G12 en sangre fue mayor que la del anticuerpo de control de isotipo y el anticuerpo de control comercial en los puntos de tiempo de exposición pico y valle.

**[0175]** Para evaluar los niveles de sFlt-1 libre en suero y los niveles de VEGF, se recogió sangre 24 horas después de la quinta dosis intravenosa y antes del sacrificio. La administración del anticuerpo 13B4 y el anticuerpo 10G12, así como el anticuerpo de control comercial, disminuyó significativamente la concentración sérica de sFlt-1 ( $p < 0,0001$ ) en comparación con el anticuerpo de control de isotipo (**Figura 3**). La administración del anticuerpo 13B4 y el anticuerpo 10G12 dio como resultado un aumento significativo en los niveles séricos de VEGF en comparación con el anticuerpo de control de isotipo ( $p < 0,001$ ) (**Figura 4**). La administración del anticuerpo de control comercial también dio como resultado un aumento significativo en los niveles sanguíneos de VEGF en comparación con el anticuerpo de control de isotipo ( $p < 0,05$ ) (**Figura 4**).

#### Histopatología

**[0176]** Los ratones se sacrificaron al final del período de tratamiento de 30 días y el músculo del diafragma y el músculo tibial anterior (TA) se recogieron y seccionaron para determinar si los anticuerpos anti-Flt-1 inducían angiogénesis en el músculo esquelético. Las secciones de músculo se tiñeron con el marcador de células endoteliales CD31. Se observó un aumento significativo en la densidad capilar en los diafragmas de los ratones tratados con el anticuerpo 13B4, 10G12 o el anticuerpo de control comercial en comparación con los diafragmas de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (**Figuras 5A-5D**). Los datos se cuantificaron usando software de imágenes cuantitativas automatizado como se muestra en las **Figuras 6A-6B**. Hubo un aumento significativo en el área positiva de CD31 en los diafragmas de los ratones tratados con el anticuerpo de control comercial ( $p < 0,05$ ), el anticuerpo 13B4 ( $p < 0,01$ ) y el anticuerpo 10G12 ( $p < 0,0001$ ) en comparación con los diafragmas de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. También se demostró un aumento significativo en el área positiva para CD31 del músculo tibial anterior (TA) de los ratones tratados con el anticuerpo 10G12 ( $p < 0,01$ ) en comparación con el músculo tibial anterior de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo.

**[0177]** Estos estudios demostraron que la administración de un anticuerpo Flt-1 (p. ej., 10G12 y 13B4) a ratones *mdx* resultó en un aumento significativo en la proliferación de células endoteliales, así como una disminución en Flt-1 soluble en suero y un aumento en concentraciones séricas de VEGF. Estos anticuerpos demostraron una afinidad de unión por el objetivo de Flt-1 en el rango de pM (consulte la **Tabla 4**), CI<sub>50</sub> para la unión de Flt-1 de menos de 100 pM (consulte la **Tabla 4**) y más del 50 % de rescate de la señalización de VEGF en un bioensayo.

#### **Ejemplo 2. Generación y caracterización de anticuerpos anti-Flt-1 de alta afinidad**

**[0178]** Se generaron anticuerpos monoclonales anti-Flt-1 adicionales como se describe anteriormente. Estos anticuerpos se caracterizaron además por su afinidad de unión al antígeno sFlt-1 (mediante ELISA y Biacore), competencia por VEGF en un ELISA de competencia sFlt-1:VEGF; y rendimiento en un ensayo basado en células.

#### Caracterización del anticuerpo - Unión al objetivo

**[0179]** Se ensayó la unión de los anticuerpos monoclonales anti-Flt-1 al antígeno sFlt-1 recombinante en un ensayo ELISA (**Figura 7**). Todos los anticuerpos demostraron un aumento de la unión dependiente de la dosis. La afinidad de unión de los anticuerpos anti-Flt-1 al antígeno Flt-1 humano y de ratón se midió mediante la metodología de resonancia de plasmón superficial (es decir, Biacore) (**Tabla 6**). Los anticuerpos se unieron a Flt-1 humano en el rango nanomolar

con el anticuerpo 11A11 demostrando la afinidad de unión más alta por Flt-1 humana. El análisis de Biacore también demostró que los anticuerpos no reaccionaron de forma cruzada con VEGF R2 o VEGF R3 (**Tabla 6**), sin embargo, todos los anticuerpos reaccionaron de forma cruzada con cynomolgus Flt-1.

5

Tabla 6.

	Familia	Afinidad (nM)		Unión	
		Humano	Ratón	VEGFR2	VEGFR3
13B4	15	0,58	1,4	-	-
10G2		1,5	1,4	-	-
10G5		1,6	4,2	-	-
18H2		1,8	3,2	-	-
18A10		1,2	2	-	-
18C5		2,7	9,2	-	-
18C12		1,4	2	-	-
18B6	21	1,7	1,2	-	-
16B3	19	2,7	3	-	-
10G12	17	3,1	6,9	-	-
16B12	18	2,7	5,7	-	-
Angio		2,3	8,2		
11A11	20	0,16		-	-

#### Caracterización de anticuerpos - Competición/antagonismo

10

**[0180]** Para estimar la potencia de los anticuerpos, los anticuerpos se ensayaron en un ELISA de competición utilizando sFlt-1 humano y VEGF. Las concentraciones de anticuerpos analizadas oscilaron entre 0,1 mg/ml y 10.000 ng/ml. El anticuerpo comercial anti-Flt-1 sirvió como control. Con la excepción de 11A11, todos los anticuerpos pudieron evitar la unión de VEGF a sFlt-1 (**Figura 8**).

#### Caracterización de anticuerpos - Ensayo basado en células

15

20

**[0181]** Se estimularon células endoteliales de vena primaria humana (HUVEC) con VEGF en presencia de sFlt-1 y anticuerpos monoclonales 02G07, 11A11 y 13B4. La activación de células inducida por VEGF se ensayó determinando el estado de fosforilación del receptor VEGF R2. Los datos se expresan como porcentaje de rescate de la fosforilación del receptor VEGF R2 en relación con la fosforilación del receptor VEGF R2 en presencia de sFlt-1 solo (p. ej., sin anticuerpos anti-Flt-1). Los anticuerpos monoclonales rescataron la activación celular (es decir, la fosforilación) antagonizando el Flt-1 soluble (**Figura 9**).

#### **Ejemplo 3. Caracterización de anticuerpos anti-Flt-1 de alta afinidad generados por transposición de cadena ligera**

25

**[0182]** La transposición de cadena ligera de los anticuerpos 18B6, 11A11 y 13B4 descritos en el Ejemplo 2 se realizó para aumentar la afinidad y la potencia de los anticuerpos candidatos.

#### Caracterización del anticuerpo - Unión al objetivo

30

**[0183]** Los anticuerpos resultantes mostraron una mayor afinidad por el antígeno Flt-1. Por ejemplo, la  $K_D$  del anticuerpo 21C6 aumentó aproximadamente 10 veces con respecto a la del anticuerpo original, 11A11. De manera similar, la  $K_D$  del anticuerpo 21B3 aumentó aproximadamente 5 veces con respecto a la del anticuerpo original, 13B4 (**Tabla 7**).

35

Tabla 7.

	$k_a$ (1/ms)	$K_D$ (1/s)	$K_D$ (M)
18B6	3,95E+05	3,25E-04	8,22E-10
24A8	2,24E+05	1,35E-04	6,05E-10
21F9	2,84E+05	2,42E-04	8,52E-10
11A11	3,17E+05	5,32E-05	1,68E-10
21C6	1,31E+06	2,62E-05	2,00E-11
21B6	7,59E+05	6,50E-05	8,57E-11
13B4	4,16E+05	1,62E-04	3,89E-10
21B3	5,58E+05	4,73E-05	8,48E-11
21A1	2,23E+05	1,15E-04	5,16E-10
21D1	8,44E+05	1,44E-04	1,71E-10
21B4	4,96E+05	1,58E-04	3,19E-10
19H6	3,32E+05	1,09E-04	3,29E-10

Caracterización de anticuerpos - Competición/antagonismo

**[0184]** Para estimar la potencia de los anticuerpos después de la mezcla de cadenas ligeras, los anticuerpos se ensayaron en un ELISA de competición usando sFlt-1 humano y VEGF. Las concentraciones de anticuerpos analizadas oscilaron entre 0,2 mg/ml y 200 ng/ml. La capacidad del anticuerpo original 13B4 para unirse de forma competitiva a sFlt-1 se comparó con la de los anticuerpos generados mediante el barajado de cadenas ligeras. Todos los anticuerpos demostraron una inhibición dependiente de la dosis de la unión de VEGF a sFlt-1 humana, siendo el clon 21B3 el competidor más eficaz (**Figura 10**).

Eficacia in vivo

**[0185]** Para determinar la vida media en suero y las características farmacocinéticas de los anticuerpos transpuestos de cadena ligera, se administró a los ratones una dosis única de 10 mg/kg de anticuerpos transpuestos de cadena ligera 27H9 y 21B3 y el anticuerpo original 13B4, cada uno marcado con  $^{125}$ I. El suero se recogió a las 0,083, 0,25, 0,5, 1, 4, 8 y 24 horas y a los 3, 5, 7, 14, 21 y 28 días y se determinó la concentración sérica de los anticuerpos. La vida media en suero se redujo en los anticuerpos transpuestos ligeros en comparación con el anticuerpo original (**Figura 11**). Sin embargo, los anticuerpos barajados de cadena ligera mostraron características farmacodinámicas mejoradas en comparación con el original. Por ejemplo, el anticuerpo 27H9 alcanzó una concentración máxima de 222,4 ug/ml a las 0,083 horas, mientras que el anticuerpo original 13B4 alcanzó una concentración máxima de 217 ug/ml a las 0,5 horas (**Tabla 8**).

Tabla 8.

TA	T1/2 (h)	Cmax (ug/ml)	Tmax (h)	AUC0-último (h*ug/ml)	AUC0-inf (h*ug/ml)	Vss (ml/kg)	Cl (ml/h/kg)	V0 (ml/kg)	R2
13B4	129,4	217,3	0,5	27044	27798	71	0,36	48,7	0,97
21B3	56,5	215,8	0,083	12590	12602	73	0,79	42,9	0,95
27H9	62,8	222,4	0,083	14318	14329	68	0,7	44,3	0,96

Histopatología

**[0186]** Para determinar si la cadena ligera mezclada y los anticuerpos parentales podían inducir la proliferación de células endoteliales, se trataron ratones *mdx* con 20 mg/kg de anticuerpo cada dos semanas durante 4 semanas mediante administración intravenosa. Los ratones se sacrificaron al final del período de tratamiento y se recogieron y seccionaron los músculos del diafragma y tibial anterior para determinar si los anticuerpos inducían la angiogénesis en el músculo esquelético. Las secciones de músculo se tiñeron con el marcador de células endoteliales CD31. Se observó un aumento significativo en la densidad capilar en el diafragma en los ratones tratados con el anticuerpo 13B4 y 21B3 en comparación con los diafragmas de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (**Figuras 12A-12C**). Además, hubo un aumento significativo en la densidad capilar en el tibial anterior de los ratones tratados con el anticuerpo de cadena ligera transpuesto 21B3 en comparación con el músculo tibial anterior de ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (**Figuras 12D-12F**).

**[0187]** La biodistribución de los anticuerpos 27H9, 13B4 y 21B3 en los músculos diafragma, tibial y gastrocnemio se determinó utilizando anticuerpos marcados con  $^{125}$ I. El diafragma mostró la mayor exposición para todos los anticuerpos a lo largo del tiempo (**Figuras 13A-13C**).

**[0188]** Estos estudios demostraron que la administración de un anticuerpo Flt-1 (es decir, 13B4 y 21B3) a ratones *mdx* dio como resultado un aumento significativo en la proliferación de células endoteliales.

**Ejemplo 4. Eficacia in vivo del anticuerpo 21B3 anti-Flt-1 de alta afinidad**

**[0189]** Se trataron ratones *Mdx* con 1, 3, 10 o 20 mg/kg de anticuerpo 21B3, o 20 mg/kg de un anticuerpo de control de isotipo, mediante administración intravenosa dos veces por semana durante un mes a partir de las 4 semanas de edad. Para evaluar la concentración de anticuerpos séricos en un punto mínimo de exposición, se recogió sangre 4 días después de la quinta dosis intravenosa. Para evaluar la concentración de anticuerpos en sangre en un punto de máxima exposición, se extrajo sangre 24 horas después de la última dosis. Las concentraciones máximas y mínimas en suero del anticuerpo 21B3 y el anticuerpo de control de isotipo se muestran en las **Figuras 14A y 14B**. Los niveles máximo y mínimo del anticuerpo 21B3 fueron dependientes de la dosis y más altos que el anticuerpo de control de isotipo.

**[0190]** Para evaluar los niveles séricos de sFlt-1 libre, se recogió sangre los días 0, 14 y 28. La administración del anticuerpo 21B3 indujo una disminución dependiente de la dosis en los niveles séricos de sFlt-1 libre. La respuesta fue más duradera con las dosis de 10 y 20 mg/kg como se observó tanto en el día 14 como en el día 28. Sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de sFlt-1 libre en las dosis de 3, 10 y 20 mg/kg como en comparación con el nivel de sFlt-1 libre en ratones tratados con vehículo solo (**Figura 15**).

[0191] Para evaluar los niveles séricos de VEGF, se recogió sangre los días 0, 14 y 28. La administración del anticuerpo 21B3 indujo un aumento dependiente de la dosis en los niveles séricos de VEGF. Como se observó para los niveles de sFlt-1 libre, la respuesta fue más duradera a las dosis de 10 y 20 mg/kg y tanto en el día 14 como en el día 28. De hecho, se observó un aumento estadísticamente significativo en el VEGF sérico a los 10 y 20 mg/kg de dosis de anticuerpo 21B3 en comparación con los niveles de VEGF en suero en ratones tratados con vehículo solo (Figura 16).

#### Histopatología

[0192] Se sacrificaron los ratones al final del período de tratamiento de 30 días y se recogieron y seccionaron los músculos del diafragma y tibial anterior para determinar si el anticuerpo anti-Flt-1 inducía la angiogénesis en el músculo esquelético. Se tiñeron secciones de músculo para el marcador de células endoteliales CD31. Se observó un aumento significativo en la densidad capilar en los músculos del diafragma de los ratones tratados con el anticuerpo 21B3 en comparación con la densidad capilar en los músculos del diafragma de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (Figuras 17A-17E). Los datos se cuantificaron utilizando un software de imágenes cuantitativas automatizado como se muestra en la Figura 18. Hubo un aumento significativo en el área positiva de CD31 en los músculos del diafragma de los ratones tratados con 10 mg/kg o 20 mg/kg ( $p < 0,0001$ ) en comparación con el área positiva de CD31 en los músculos del diafragma de ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo.

[0193] También se observó un aumento significativo en la densidad capilar en el músculo tibial anterior en los ratones tratados con el anticuerpo 21B3 en comparación con el músculo tibial anterior en los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (Figuras 19A-19E). Los datos se cuantificaron usando un software de imágenes cuantitativas automatizado como se muestra en la Figura 20. Hubo un aumento significativo en el área positiva de CD31 en el músculo tibial anterior de ratones tratados con 10 mg/kg o 20 mg/kg ( $p < 0,0001$ ) en comparación con al área positiva de CD31 en el músculo tibial anterior de ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo.

#### Caracterización por RP-LC/MS

[0194] El peso molecular del anticuerpo 21B3 desglicosilado se determinó mediante cromatografía líquida de fase inversa/espectrometría de masas (RP-LC/MS) (Figura 21A). Después de una reacción de reducción, se determinó el peso molecular de la cadena ligera y la cadena pesada. También se determinó el patrón de glicosilación de la cadena pesada (Figura 21B).

[0195] Estos resultados demostraron que la administración de un anticuerpo Flt-1 (es decir, 21B3) a ratones *mdx* dio como resultado un aumento significativo en la proliferación de células endoteliales, así como una disminución de Flt-1 soluble en suero y un aumento en las concentraciones de VEGF en suero.

#### Ejemplo 5. Caracterización de anticuerpos anti-Flt-1 humanizados de alta afinidad

[0196] Los anticuerpos transpuestos de cadena ligera descritos en el Ejemplo 3 se modificaron adicionalmente para introducir variación de secuencia en las regiones CDR y/o regiones efectoras Fc. Estos anticuerpos fueron evaluados por una metodología de resonancia de plasmones de superficie (por ejemplo, Biacore) para determinar las características de unión (Tabla 9). El anticuerpo 27H9 NG/NA AAA demostró una afinidad de unión por Flt-1 reducida aproximadamente en 2 veces.

Tabla 9.

	ka (1/ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>	Exp
21B3 WT	5,4E+05	1,7E-04	292	3,2E-10	290	2
21B3 AAA	5,2E+05	1,1E-04	305	2,1E-10	371	2
27H9 de edad 07/05	3,5E+05	7,9E-05	306	2,3E-10	235	1
27H9 peso 23/07	3,3E+05	8,4E-05	323	2,6E-10	236	1
27H9 NG/QG	3,7E+05	1,3E-04	315	3,6E-10	280	1
27H9 NG/NA	2,9E+05	1,1E-04	298	3,9E-10	158	1
27H9 NG/NA	2,9E+05	1,5E-04	240	5,1E-10	96,4	2
27H9 NG/NA AAA	2,9E+05	1,5E-04	236	5,1E-10	72,5	2

[0197] Los anticuerpos también se evaluaron en el ensayo basado en células para la capacidad de rescatar la activación celular antagonizando sFlt-1. Se estimularon células endoteliales de vena primaria humana (HUVEC) con VEGF en presencia de sFlt-1 y los anticuerpos monoclonales. La activación de células inducida por VEGF se ensayó determinando el estado de fosforilación del receptor VEGF R2. Los anticuerpos monoclonales rescataron la activación celular (es decir, la fosforilación) al antagonizar Flt-1 soluble (Figura 22A) y el anticuerpo 27H9 NG/NA AAA (NA+AAA) tenía una potencia similar en comparación con el anticuerpo original no mutado (wt).

### Ejemplo 6. Optimización de anticuerpos

**[0198]** Se analizaron los anticuerpos candidatos para identificar las secuencias de línea germinal VH y VL humanas más cercanas y para identificar residuos diferentes dentro de las regiones marco y sitios de oxidación/isomerización dentro de las CDR. Se construyó una biblioteca Fab que contenía residuos humanos y de tipo salvaje y se fusionó con dominios constantes humanos. Se aplicó la presentación de fagos para identificar Fabs con una velocidad idéntica o mejor (es decir, sin pérdida de afinidad) que el anticuerpo original, 21B3. Los Fab con la tasa de desviación deseada se secuenciaron y compararon con la secuencia de la línea germinal humana y aquellos con la mayor identidad (p. ej., identidad VH+VL >95 %) y homología (p. ej., >96 % de homología) se seleccionaron para convertirlos en anticuerpos monoclonales humanos. Los Fab también se analizan en busca de aminoácidos no deseados. La **Tabla 10** proporciona Fab clasificados por porcentaje de identidad humana con algunos clones que tienen hasta un 97,6 % de identidad humana y un 98,8 % de homología.

Tabla 10.

CLASIFICADO POR IDENTIDAD				
IDENTIDAD FAB			MEJOR de kd	kd
	%Ident	%Homol		
27H4_VH	97,6%	98,8%	1,06	5,1E-04
27H9_VH	97,5%	98,2%	1,12	4,8E-04
25F11_VH	97,5%	98,2%	1,00	5,3E-04
27H6_VH	97,5%	97,5%	0,96	5,6E-04
25A2_VH	97,0%	98,8%	0,97	5,5E-04
27D3_VH	97,0%	98,2%	0,89	6,0E-04
27B4_VH	97,0%	98,2%	0,84	6,4E-04
25D4_VH	97,0%	98,8%	0,94	5,7E-04
25D6_VH	97,0%	98,2%	1,17	4,6E-04
25G9_VH	97,0%	98,2%	0,97	5,5E-04
27C5_VH	97,0%	98,2%	0,96	5,5E-04
25D11_VH	97,0%	98,2%	0,90	6,0E-04
25C8_VH	97,0%	97,5%	0,84	6,3E-04
25G2_VH	96,9%	98,2%	0,81	6,6E-04
27A1_VH	96,4%	98,2%	0,97	5,5E-04
25H3_VH	96,4%	97,5%	0,94	5,7E-04
27F5_VH	96,3%	98,2%	1,18	4,5E-04
25B9_VH	96,3%	98,2%	1,03	5,2E-04
27H1_VH	96,3%	98,2%	0,91	5,9E-04
27G9_VH	96,3%	97,5%	1,30	4,1E-04
27D9_VH	96,3%	97,5%	0,94	5,7E-04
25G8_VH	96,3%	97,5%	0,82	6,5E-04
21B3	93,3%	96,3%		5,3E-04

### Ejemplo 7. Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-Flt-1

**[0199]** La termotolerancia de los anticuerpos monoclonales se analizó utilizando un método Biacore. A una concentración de 100 µg/ml, cada anticuerpo monoclonal se incubó durante 1 hora en solución salina tamponada con fosfato a diferentes temperaturas. Después de 1 hora de incubación, el anticuerpo se enfrió lentamente a 25 °C durante dos horas y luego se incubó durante la noche a 4 °C. A continuación, se midió el porcentaje de anticuerpo funcional determinando la unión a Flt-1 humana mediante Biocore (véase la **Tabla 11**). La termotolerancia para los anticuerpos de tipo salvaje fue consistente con experimentos previos. Sin embargo, con la excepción del clon 27H6 DG/DA, las mutaciones en las regiones VH o VL redujeron la temperatura de fusión en aproximadamente 2°C. La mutación AAA en la región Fc no tuvo efecto sobre la termotolerancia del anticuerpo.

Tabla 11.

Tm (°C)						
MAB	Exp 140421	Exp 140507	Exp 140514	Exp 140613	Exp 140723	Exp 140902
21B3 WT	70,1	70,4	70,9	69,1		70,5
21B3 AAA						~ 70,8
27H4 WT	67	67,8		~ 66,6	67,5	
27H4 NG/NA (VH)					~ 64,1	
27H4 NG/QG (VH)					~ 64,1	

(Continuación)

Tm (°C)						
MAB	Exp 140421	Exp 140507	Exp 140514	Exp 140613	Exp 140723	Exp 140902
27H4 NA + AAA						64,9
27H6 WT					61,9	
27H6 GD/DA (VL)					~ 63,4	
27H6 DG/EG (VL)					58,8	
27H9 WT			73,8	68,6	69,0	
27H9 NG/NA (VH)					66,8	
27H9 NG/QG (VH)					66,7	
27H9 NA + AAA						67,3

**[0200]** Biacore analizó la afinidad de unión de los clones humanizados (**Tabla 12**). Se determinó la capacidad para rescatar la señalización de VEGF en un ensayo basado en células VEGF:sFlt-1 para los anticuerpos 27H4, 27H6 y 27H9 (**Figura 22B**). Brevemente, se estimularon células endoteliales de vena primaria humana (HUVEC) con VEGF en presencia de sFlt-1 y anticuerpos monoclonales 27H4, 27H6 y 27H9. La activación de células inducida por VEGF se ensayó determinando el estado de fosforilación del receptor VEGF R2. Los datos se expresan como porcentaje de rescate de la fosforilación del receptor VEGF R2 en relación con la fosforilación del receptor VEGF R2 en presencia de sFlt-1 solo (p. ej., sin anticuerpos anti-Flt-1). También se determinó la capacidad de antagonizar la unión de VEGF y sFlt-1 (**Figura 23**) para los anticuerpos 27H4, 27H6 y 27H9 mediante ELISA.

Tabla 12.

	ka (1/ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)
21B3	5,4E+05	1,7E-04	292	3,2E-10
27H4	3,4E+05	8,2E-05	305	2,5E-10
27H9	3,3E+05	8,4E-05	323	2,6E-10
27H6	9,1E+05	1,4E-04	436	1,6E-10

#### Ejemplo 8. Estudio *in vitro* de anticuerpos anti-Flt-1 en patología muscular

**[0201]** Se trataron ratones *Mdx* con 1, 3 o 10 mg/kg de anticuerpo anti-Flt-1 21B3 o 10 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo IgG1 por administración intravenosa dos veces por semana durante 6 o 12 semanas a partir de las 3 semanas de edad.

**[0202]** Para evaluar los niveles séricos de concentración de anticuerpos libres, se recogió sangre de los ratones 4 días después de la dosis intravenosa administrada a las 2, 4, 7 y 10 semanas. La muestra de sacrificio se recogió 24 horas después de la última dosis (**Figura 24**). Con la dosis de 10 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de anticuerpo libre en todos los puntos de tiempo en relación con los niveles séricos de anticuerpo libre en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo. Con la dosis de 3 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de anticuerpo libre en las semanas 4, 7 y 10 y en el sacrificio en relación con los niveles séricos de anticuerpo libre en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo. Con la dosis de 1 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de anticuerpo libre en el sacrificio en relación con los niveles séricos de anticuerpo libre en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo.

**[0203]** Para evaluar los niveles séricos de sFlt-1 libre, se recogió sangre de los ratones 4 días después de la dosis intravenosa administrada a las 2, 4, 7 y 10 semanas. La muestra de sacrificio se recogió 24 horas después de la última dosis (**Figura 25**). Con la dosis de 10 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de sFlt-1 libre en todos los puntos temporales en relación con los niveles séricos de sFlt-1 libre en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo. Con la dosis de 3 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de sFlt-1 libre en las semanas 4, 7 y 10 y en el sacrificio en relación con los niveles séricos de sFlt-1 libre en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo. A la dosis de 1 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de sFlt-1 libre en el sacrificio en relación con los niveles séricos de sFlt-1 libre en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo.

**[0204]** Para evaluar los niveles séricos de VEGF, se recogió sangre de los ratones 4 días después de la dosis intravenosa administrada a las 2, 4, 7 y 10 semanas. La muestra de sacrificio se recogió 24 horas después de la última dosis (**Figura 26**). La administración del anticuerpo 21B3 indujo un aumento dependiente de la dosis en los niveles de VEGF en suero. Con la dosis de 10 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de VEGF en todos los puntos de tiempo en relación con los niveles séricos de VEGF en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo. Con la dosis de 3 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de VEGF en la semana 7 y en el sacrificio en relación con los niveles séricos de VEGF en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo. Con la dosis de 1 mg/kg, hubo una diferencia estadísticamente



significativa en los niveles séricos de VEGF en el sacrificio en relación con los niveles de suero de VEGF en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo.

#### Histopatología

**[0205]** Los ratones se sacrificaron en las semanas 6 y 12 del período de tratamiento y se recogieron y seccionaron los músculos diafragma, gastrocnemio y tibial anterior para determinar si el tratamiento con el anticuerpo anti-Flt-1 inducía la angiogénesis y prevenía la fibrosis y la necrosis en el músculo esquelético.

#### Angiogénesis

**[0206]** Se tiñeron secciones de músculo para el marcador de células endoteliales CD31 (**Figuras 27A-27H, 28A-28H y 29A-29H**). Se observó un aumento significativo en la densidad capilar en todos los grupos musculares estudiados en los ratones tratados con el anticuerpo 21B3 en comparación con los músculos de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. Los datos se cuantificaron usando un software de imágenes cuantitativas automatizado. Hubo un aumento estadísticamente significativo en el área positiva de CD31 en el músculo del diafragma de los ratones tratados con 3 mg/kg ( $p<0,01$ ) y 10 mg/kg ( $p<0,0001$ ) del anticuerpo 21B3 a las 6 y 12 semanas en comparación con el área positiva de CD31 en el músculo del diafragma de ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. Hubo un aumento estadísticamente significativo en el área positiva para CD31 en el músculo gastrocnemio de los ratones tratados con 10 mg/kg ( $p<0,05$ ) del anticuerpo 21B3 a las 6 y 12 semanas en comparación con el área positiva para CD31 en el músculo gastrocnemio de los ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo. Hubo un aumento estadísticamente significativo en el área positiva de CD31 en el músculo tibial anterior de ratones tratados con 3 mg/kg de anticuerpo 21B3 a las 6 semanas ( $p<0,05$ ) y 12 semanas ( $p<0,0001$ ) y de ratones tratados con 10 mg/kg ( $p<0,0001$ ) de anticuerpo 21B3 a las 6 y 12 semanas en comparación con el área positiva de CD31 en el músculo tibial anterior de ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. (**Figuras 30A-30C**).

#### Fibrosis

**[0207]** También se tiñeron secciones de músculo mediante inmunohistoquímica para colágeno tipo I (**Figuras 31A-31H, 32A-32H y 33A-33H**). Se observó una disminución significativa en la tinción de colágeno tipo I en el diafragma y el músculo gastrocnemio de los ratones tratados con el anticuerpo 21B3 en comparación con el diafragma y el músculo gastrocnemio de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. Hubo una disminución estadísticamente significativa en la tinción de colágeno tipo I en el músculo del diafragma de ratones tratados con 1 mg/kg ( $p<0,0001$ ), 3 mg/kg ( $p<0,001$ ) y 10 mg/kg ( $p<0,0001$ ) de anticuerpo 21B3 a las 12 semanas en comparación con la tinción de colágeno tipo I en el músculo del diafragma de ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. Hubo una disminución estadísticamente significativa en la tinción de colágeno tipo I en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con 1 mg/kg ( $p<0,01$ ), 3 mg/kg ( $p<0,05$ ) y 10 mg/kg ( $p<0,001$ ) de anticuerpo 21B3 a las 12 semanas en comparación con la tinción de colágeno tipo I en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. (**Figuras 34A-34C**).

#### Necrosis

**[0208]** El porcentaje de necrosis presente en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con el anticuerpo 21B3 se determinó en relación con el porcentaje de necrosis presente en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo. Se observó una tendencia hacia la mejora en la necrosis (**Figuras 35A-35B**).

#### **Ejemplo 9. Mapeo del epítipo en sFlt-1 humano dirigido por anticuerpos anti-Flt-1 21B3 y 21C6**

**[0209]** Los epítipos de nivel de péptido en sFlt-1 humano dirigidos por anticuerpos monoclonales (mAb) de sFlt-1 anti-humanos 21B3 y 21C6 se establecieron mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX).

#### Digestión con pepsina y LC-MS

**[0210]** Para la digestión con pepsina, 10 µg de sFlt-1 o sFlt-1 y una mezcla de anticuerpo (21B3) (10 µg:20 µg) o una mezcla de sFlt-1 y anticuerpo (21C6) (10 µg:20 µg) se desnaturalizó en TCEP 0,365 M y clorhidrato de guanidina 1,7 M (pH 2,5). La mezcla se sometió a digestión con pepsina en línea y los péptidos resultantes se analizaron usando un sistema UPLC-MS compuesto por un Waters Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas MicroTOF-Q2 (Bruker). Los péptidos se separaron en una columna C8 de 50 mm x 1 mm con un gradiente de 19 min del disolvente B al 5-28,5 % (ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). El disolvente A es ácido fórmico al 0,1 % en agua. La válvula de mezcla de disolvente, la válvula de inyección, la columna C8 y todos los tubos de acero inoxidable de conexión se sumergieron en un baño de agua circulante enfriada mantenido a 0 °C. La identificación de péptidos se realizó mediante la búsqueda de datos MS/MS frente a la secuencia sFlt-1 con Mascot. La tolerancia de masa para los iones precursores y productos fue de 0,1 Da y 0,2 Da, respectivamente.

Tratamiento de desglucosilación

[0211] Se incubaron 200 µg de proteína recombinante sFlt-1 humana con 10 ml de PNGasa F a 37 °C durante 4 horas.

5 Preparación de Fab

[0212] Los Fab se prepararon a partir de dos mAbs anti-sFlt-1 (21B3 y 21C6) con digestión con papaína y captura de Proteína A usando el kit de preparación de Pierce Fab.

10 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

[0213] Para comprobar la unión entre sFlt-1 humano nativo o desglucosilado y dos mAbs anti-sFlt-1 humano (21B3 y 21C6) en SEC, 10 µg de sFlt-1 (ya sea nativo o desglucosilado) se mezcló con 40 µg de mAbs anti-sFlt-1. Se inyectaron sFlt-1 nativo o desglucosilado solo, mAb anti-sFlt-1 solo o los complejos en una columna SEC a un caudal de 0,35 ml/min con PBS como fase móvil y las proteínas se controlaron a 280 nm. Los Fab generados a partir de mAb anti-sFlt-1 (21B3 y 21C6) y la unión entre Fab anti-sFlt-1 y sFlt-1 también se evaluaron mediante SEC.

HDX

[0214] Se incubó 10 µL de sFlt-1 humano (10 µg) o mezcla de sFlt-1 y mAb (21B3) (10 µg:20 µg) o mezcla de sFlt-1 y mAb (21C6) (10 µg:20 µg) con 90 µL de tampón de marcaje de óxido de deuterio (fosfato 50 mM, cloruro de sodio 100 mM a pH 7,4) durante 0 s, 30 s, 2 min, 10 min, 1 h o 4 h. El intercambio de deuterio se inactivó agregando 100 µL de clorhidrato de guanidina 3,4 M, tampón TCEP 0,73 M con un pH final de 2,5 y luego se sometió a digestión con pepsina y análisis LC-MS descritos anteriormente. Los espectros de masas se registraron en modo solo MS. Los datos de MS sin procesar se procesaron utilizando el software HDExaminer (Sierra Analytics, CA). Los niveles de deuterio se calcularon usando la diferencia de masa promedio entre el péptido deuterado y su forma nativa (to).

Resultados

[0215] Para verificar que la eliminación de glicanos no altera la unión de sFlt-1 humano a los anticuerpos, se mezcló la proteína sFlt-1 nativa y desglucosilada con IgG anti-sFlt-1 humano (21B3 y 21C6) y la formación del complejo fue monitoreada en cromatografía de exclusión por tamaño. Los datos demostraron que el sFlt-1 humano nativo se une por completo a dos IgG anti-sFlt-1 humanos (21B3 y 21C6), mientras que el sFlt-1 humano desglucosilado se une de forma incompleta al mAb anti-sFlt-1 humano (21B3) o no se une a mAb anti-sFlt-1 humano (21C6), que indicó que la desglucosilación perturba las interacciones entre el sFlt-1 humano y los anticuerpos. Por lo tanto, se seleccionó sFlt-1 humano nativo para realizar experimentos de intercambio de HD. Inicialmente se logró una cobertura deficiente de la secuencia para la sFlt-1 humana nativa debido a la alta complejidad de la glicosilación heterogénea y los sitios de glicosilación unidos a 12 N. Para mejorar la cobertura de la secuencia, se identificaron las masas de glicano en cada sitio de glicosilación y se logró una alta cobertura de la secuencia (85,2 %) para la sFlt-1 humana nativa.

[0216] Se incubó sFlt-1 humano nativo en óxido de deuterio solo o en complejo con mAb sFlt-1 antihumano (21B3) o mAb sFlt-1 antihumano (21C6). El intercambio de deuterio se realizó a temperatura ambiente durante 0 s, 30 s, 2 min, 10 min, 60 min y 240 min. La reacción de intercambio se extinguió con un pH bajo y las proteínas se digirieron con pepsina. Los niveles de deuterio en los péptidos identificados se controlaron a partir del cambio de masa en LC-MS. Se trazaron las curvas de acumulación de deuterio a lo largo del tiempo de intercambio para todos los péptidos. Mientras que la mayoría de los péptidos sFlt-1 humanos mostraban niveles de deuterio idénticos o similares con y sin mAb sFlt-1 antihumano (21B3 y 21C6), varios segmentos peptídicos habían disminuido significativamente la incorporación de deuterio tras la unión de mAb 21B3 o mAb 21C6. Los residuos 117-129 (correspondientes a los aminoácidos 141-153 de SEQ ID NO: 90) y 169-182 (correspondientes a los aminoácidos 193-206 de SEQ ID NO: 90) experimentaron una fuerte protección de deuterio al unirse a sFlt-1 mAb 21B3 antihumano, mientras que los residuos 106-114 (correspondientes a los aminoácidos 130-138 de SEQ ID NO: 90) y 117-124 (correspondientes a los aminoácidos 141-148 de SEQ ID NO: 90) experimentaron una fuerte protección de deuterio al unirse a mAb 21C6 anti-sFlt-1 humano. Estas regiones fuertemente protegidas se asignaron como péptidos epitópicos para mAb sFlt-1 antihumano (21B3 y 21C6) y se resaltaron en azul en el mapa de calor diferencial que se muestra en la **Figura 36** y la **Figura 37**. Los espectros MS/MS para péptidos identificados que contienen amino los residuos de ácido de las regiones del epítipo se muestran en la **Figura 38A-38E**. El péptido 115-124 corresponde a los aminoácidos 139-148 de SEQ ID NO: 90; el péptido 115-129 corresponde a los aminoácidos 139-153 de SEQ ID NO: 90; el péptido 154-182 corresponde a los aminoácidos 178-206 de SEQ ID NO: 90; el péptido 175-180 corresponde a los aminoácidos 119-204 de SEQ ID NO: 90; y el péptido 104-114 corresponde a los aminoácidos 128-138 de SEQ ID NO: 90.

Conclusión

[0217] Se logró una cobertura de secuencia del 85,2 % para sFlt-1 humana. Los residuos 117-129 y 169-180 experimentaron una fuerte protección contra el deuterio al unirse al mAb 21B3 de sFlt-1 antihumano, mientras que los residuos 106-114 y 117-124 experimentaron una fuerte protección contra el deuterio al unirse al mAb 21C6 de sFlt-1 antihumano. Estas regiones fuertemente protegidas se asignaron como péptidos epitópicos para el mAb sFlt-1

antihumano correspondiente.

Tabla 13.

Secuencia de aminoácidos de Flt-1 humana isoforma 1 (NP_002010.2 GI:156104876; SEQ ID NO: 90)							
1	MVSYWDTGVL	LCALLSCLLL	TGSSSGSKLK	DPELSLKGTQ	HIMQAGQTLH	LQCRGEAAHK	
61	WSLPPEMVSKE	SERLSITKSA	CGRNGKQFCS	TLTLNTAQAN	HTGFYSCSKYL	AVPTSKKKET	
121	ESAIYIFISD	TGRPFVEMYS	EIPEIIHMTE	GRELVIPCRV	TSPNITVTLK	KFPLDTLIPD	
181	GKRIIWDSRK	GFIISNATYK	EIGLLTCEAT	VNGHLYKTNY	LTHRQTNTII	DVQISTPRPV	
241	KLLRGHTLV	NCTATTPLNT	RVQMTWSYPD	EKNKRASVRR	RIDQSNCHAN	IFYSVLTIDK	
301	MQNKDKGLYT	CRVRSGPSFK	SVNTSVHIYD	KAFITVKHRK	QQVLETVAGK	RSYRLSMKVK	
361	AFPSPEVVWL	KDGLPATEKS	ARYLTRGYSL	IIKDVTEEDA	GNYTILLSIK	QSNVFNKNTA	
421	TLIVNVKPQI	YEKAVSSFPD	PALYPLGSRQ	ILTCTAYGIP	QPTIKWFWHP	CNNHNSHARC	
481	DFCSNNEESF	ILDADSNMGN	RIESITQDMA	IEGKKNMAS	TLVVADSRIS	GIYICIASNK	
541	VGTVGRNISF	YITDVPNGFH	VNLEKMPTEG	EDLKLSTVN	KFLYRDVTWI	LLRTVNNRTM	
601	HYSISKQKMA	ITKEHSITLN	LTIMNVSLQD	SGTYACRARN	VYTGEEILQK	KEITIRDQEA	
661	PYLLRNLSDH	TVAISSSTTL	DCHANGVPEP	QITWFKNNHK	IQQEPGIILG	PGSSTLFIER	
721	VTEEDEGVYH	CKATNQKGSV	ESSAYLTVQG	TSDEKSNLELI	TLTCTCVAAT	LFWLLLTLEFI	
781	RKMKRSSSEI	KTDYLSIIMD	PDEVPLDEQC	ERLPYDASKW	EFARERLKLK	KSLGRGAFGK	
841	VVQASAFGIK	KSPTCRTVAV	KMLKEGATAS	EYKALMTELK	ILTHIGHHLN	VNLLGACTK	
901	QGGPLMVIVE	YCKYGNLSNY	LKSKRDLFFL	NKDAALHMEP	KKEKMEPGLE	QGGKPRLDSV	
961	TSSSEFASSG	FQEDKSLSDV	EEEEDSDGFY	KEPITMEDLI	SYSFQVARGM	EFLSSRKCIH	
1021	RDLAARNILL	SENNVVKICD	FGLARDIYKN	PDYVRKGDTR	LPLKWMAPES	IFDKIYSTK	
1081	DVWSYGVLLW	EIFSLGGSPY	PGVQMEDDFC	SRLREGMRMR	APEYSTPEIY	QIMLDCWHRI	
1141	PKERPRFAEL	VEKLGDLLQA	NVQQDGKDYI	PINAILTGNS	GFTYSTPAFS	EDFFKESIS	
1201	PKFNSGSSDD	VRYVNAFKFM	SLERIKTFEE	LLPNATSMFD	DYQGDSSSTL	ASPMLKRTV	
1261	TDSKPKASLK	IDLRVTSKSK	ESGLSDVSRP	SFCHSSCGHV	SEKRRFTYD	HAELEKIA	
1321	CSPPPDYNSV	VLYSTPPI					
Secuencia de aminoácidos de Flt-1 humana, isoforma X1 (XP_011533316.1 GI:767977511; SEQ ID NO:91)							
1	MVSYWDTGVL	LCALLSCLLL	TGSSSGSKLK	DPELSLKGTQ	HIMQAGQTLH	LQCRGEAAHK	
61	WSLPPEMVSKE	SERLSITKSA	CGRNGKQFCS	TLTLNTAQAN	HTGFYSCSKYL	AVPTSKKKET	
121	ESAIYIFISD	TGRPFVEMYS	EIPEIIHMTE	GRELVIPCRV	TSPNITVTLK	KFPLDTLIPI	
181	GKRIIWDSRK	GFIISNATYK	EIGLLTCEAT	VNGHLYKTNY	LTHRQTNTII	DVQISTPRPV	
241	KLLRGHTLV	NCTATTPLNT	RVQMTWSYPD	EKNKRASVRR	RIDQSNCHAN	IFYSVLTIDK	
301	MQNKDKGLYT	CRVRSGPSFK	SVNTSVHIYD	KAFITVKHRK	QQVLETVAGK	RSYRLSMKVK	
361	AFPSPEVVWL	KDGLPATEKS	ARYLTRGYSL	IIKDVTEEDA	GNYTILLSIK	QSNVFNKNTA	
421	TLIVNVKPQI	YEKAVSSFPD	PALYPLGSRQ	ILTCTAYGIP	QPTIKWFWHP	CNNHNSHARC	
481	DFCSNNEESF	ILDADSNMGN	RIESITQDMA	IEGKKNMAS	TLVVADSRIS	GIYICIASNK	
541	VGTVGRNISF	YITDVPNGFH	VNLEKMPTEG	EDLKLSTVN	KFLYRDVTWI	LLRTVNNRTM	
601	HYSISKQKMA	ITKEHSITLN	LTIMNVSLQD	SGTYACRARN	VYTGEEILQK	KEITIRDQEA	
661	PYLLRNLSDH	TVAISSSTTL	DCHANGVPEP	QITWFKNNHK	IQQEPDADPH	IQKADCTFFI	

(Continuación)

Secuencia de aminoácidos de Flt-1 humana, precursor de la isoforma 2 (NP_001153392.1 GI:229892220; SEQ ID NO:92)									
1	MVSYWDTGVL	LCALLSCLLL	TGSSSGSKLK	DPELSLKGTQ	HIMQAGQTLH	LQCRGEAAH			
61	WSPPEMVSKE	SERLSITKSA	CGRNGKQFCS	TLTLNTAQAN	HTGFYSCKYL	AVPTSKKKEI			
121	ESAIYIFISD	TGRPFVEMYS	EIPEIIHMTE	GRELVIPCRV	TSPNITVTLK	KFPLDTLIPI			
181	GKRIIWDSRK	GFIISNATYK	EIGLLTCEAT	VNGHLYKTN	LTHRQNTNII	DVQISTPRPV			
241	KLLRGHTLV	NCTATTPLNT	RVQMTWSYP	EKNKRASVRR	RIDQSNCHAN	IFYSVLTDIF			
301	MQNKDKGLYT	CRVRSGPSFK	SVNTSVHIYD	KAFITVKHRK	QQVLETVAGK	RSYRLSMKVF			
361	AFPSPEVVWL	KDGLPATEKS	ARYLTRGYSL	IIKDVTEEDA	GNYTILLSIK	QSNVFNLTZ			
421	TLIVNVKPKI	YEKAVSSFPD	PALYPLGSRQ	ILTCTAYGIP	OPTIKFWFHP	CNNHNSHARC			
481	DFCSNNEESF	ILDADSNMGN	RIESITQORM	IIEGKNKMAS	TLVVADSRIS	GIYICIASNF			
541	VGTVGRNISF	YITDVPNGFH	VNLEKMPTEG	EDLKLSTCTN	KFLYRDVTWI	LLRTVNNRTM			
601	HYSISKQKMA	ITKEHSITLN	LTIMNVSLQD	SGTYACRARN	VYTGEELQK	KEITIRGEHC			
661	NKKAFFSRIS	KFKSTRNDCT	TQSNVKH						
Secuencia de aminoácidos de Flt-1 humana, precursor de la isoforma 3 (NP_001153502.1 GI:229892300; SEQ ID NO:93)									
1	MVSYWDTGVL	LCALLSCLLL	TGSSSGSKLK	DPELSLKGTQ	HIMQAGQTLH	LQCRGEAAH			
61	WSPPEMVSKE	SERLSITKSA	CGRNGKQFCS	TLTLNTAQAN	HTGFYSCKYL	AVPTSKKKEI			
121	ESAIYIFISD	TGRPFVEMYS	EIPEIIHMTE	GRELVIPCRV	TSPNITVTLK	KFPLDTLIPI			
181	GKRIIWDSRK	GFIISNATYK	EIGLLTCEAT	VNGHLYKTN	LTHRQNTNII	DVQISTPRPV			
241	KLLRGHTLV	NCTATTPLNT	RVQMTWSYP	EKNKRASVRR	RIDQSNCHAN	IFYSVLTDIF			
301	MQNKDKGLYT	CRVRSGPSFK	SVNTSVHIYD	KAFITVKHRK	QQVLETVAGK	RSYRLSMKVI			
361	AFPSPEVVWL	KDGLPATEKS	ARYLTRGYSL	IIKDVTEEDA	GNYTILLSIK	QSNVFNLTZ			
421	TLIVNVKPKI	YEKAVSSFPD	PALYPLGSRQ	ILTCTAYGIP	OPTIKFWFHP	CNNHNSHARC			
481	DFCSNNEESF	ILDADSNMGN	RIESITQORM	IIEGKNKMAS	TLVVADSRIS	GIYICIASNI			
541	VGTVGRNISF	YITDVPNGFH	VNLEKMPTEG	EDLKLSTCTN	KFLYRDVTWI	LLRTVNNRTM			
601	HYSISKQKMA	ITKEHSITLN	LTIMNVSLQD	SGTYACRARN	VYTGEELQK	KEITIRDQEI			
661	PYLLRNLSDH	TVAISSSTTL	DCHANGVPEP	QITWFKNNHK	IQQPELYTS	TSPSSSSSSI			
721	LSSSSSSSSS	SSS							
Secuencia de aminoácidos de Flt-1 humana, precursor de la isoforma 4 (NP_001153503.1 GI:229892302; SEQ ID NO:94)									
1	MVSYWDTGVL	LCALLSCLLL	TGSSSGSKLK	DPELSLKGTQ	HIMQAGQTLH	LQCRGEAAH			
61	WSPPEMVSKE	SERLSITKSA	CGRNGKQFCS	TLTLNTAQAN	HTGFYSCKYL	AVPTSKKKEI			
121	ESAIYIFISD	TGRPFVEMYS	EIPEIIHMTE	GRELVIPCRV	TSPNITVTLK	KFPLDTLIPI			
181	GKRIIWDSRK	GFIISNATYK	EIGLLTCEAT	VNGHLYKTN	LTHRQNTNII	DVQISTPRPV			
241	KLLRGHTLV	NCTATTPLNT	RVQMTWSYP	EKNKRASVRR	RIDQSNCHAN	IFYSVLTDIF			
301	MQNKDKGLYT	CRVRSGPSFK	SVNTSVHIYD	KAFITVKHRK	QQVLETVAGK	RSYRLSMKVF			
361	AFPSPEVVWL	KDGLPATEKS	ARYLTRGYSL	IIKDVTEEDA	GNYTILLSIK	QSNVFNLTZ			
421	TLIVNVKPKI	YEKAVSSFPD	PALYPLGSRQ	ILTCTAYGIP	OPTIKFWFHP	CNNHNSHARC			
481	DFCSNNEESF	ILDADSNMGN	RIESITQORM	IIEGKNKLPP	ANSSFMPLPT	SFSSNYFHFI			
541	P								

Tabla 14.

Secuencia de región Fc (SEQ ID NO: 104)							
209	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSI	
269	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAI	
329	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSREEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPI	
389	NNYKTTPPVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPG	

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

- (a) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende el aminoácido secuencia de SEQ ID NO: 60 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45,
- (b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38,
- (c) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y una región variable de cadena pesada (VH) región que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45,
- (d) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, o
- (e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende el aminoácido secuencia de SEQ ID NO: 51 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en IgG, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFv, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, opcionalmente en los que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es IgG, opcionalmente en los que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es IgG1.

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal, opcionalmente donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, opcionalmente donde el anticuerpo monoclonal humanizado contiene una región humana Fc, opcionalmente en la que la región Fc contiene una o más mutaciones que mejoran la afinidad de unión entre la región Fc y el receptor FcRn de manera que se prolongue la semivida *in vivo* del anticuerpo, opcionalmente en la que la región Fc contiene una o más mutaciones en posiciones correspondientes a Leu 234, Leu 235 y/o Gly 237 de IgG1 humana.

4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-Flt-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- (a) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID NO: 76 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 71,
- (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 85 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 72,
- (c) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 84 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 71,
- (d) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 86 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 73, o
- (e) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 83 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 70.

5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método para tratar una enfermedad, trastorno o afección mediada por Flt-1, en el que la enfermedad, trastorno o afección mediada por Flt-1 es distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, preeclampsia, enfermedad renal crónica o fibrosis tisular.

6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Una célula de hibridoma que produce el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

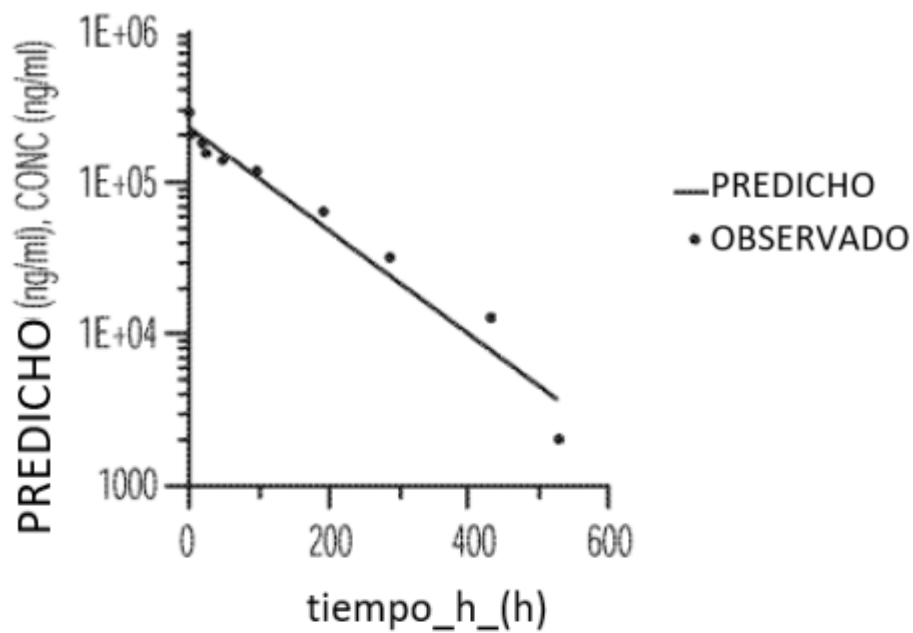


Figura 1A

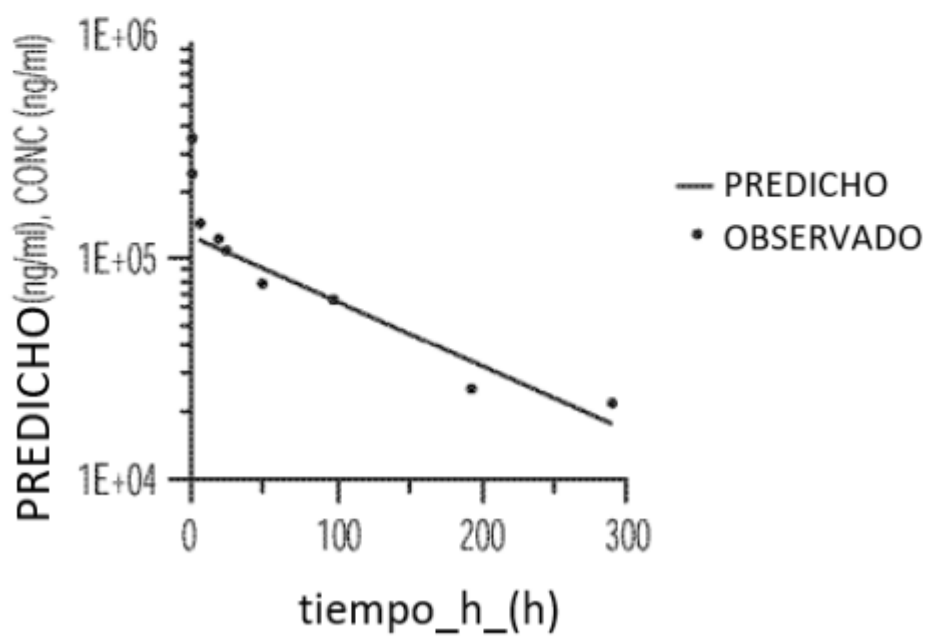


Figura 1B

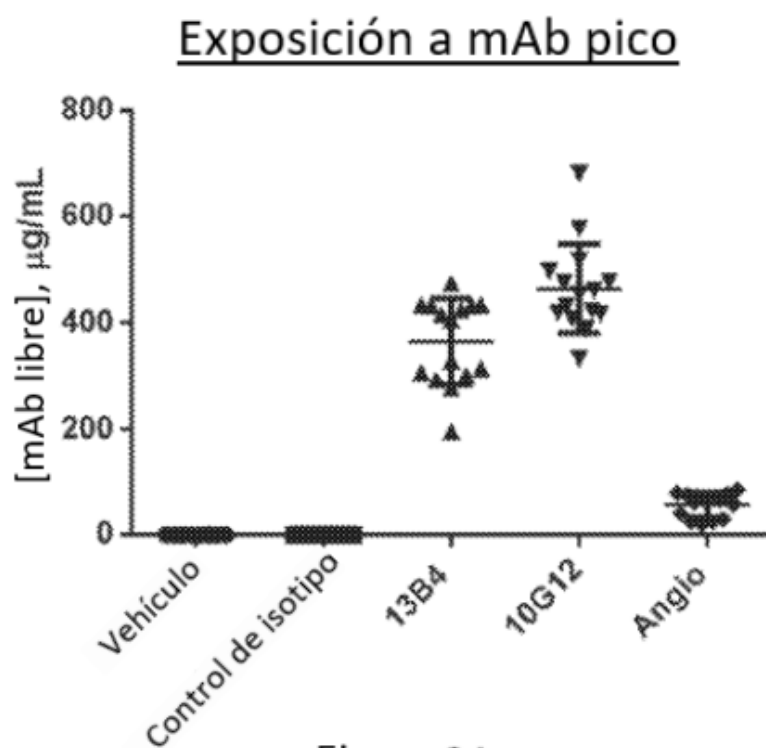


Figura2A

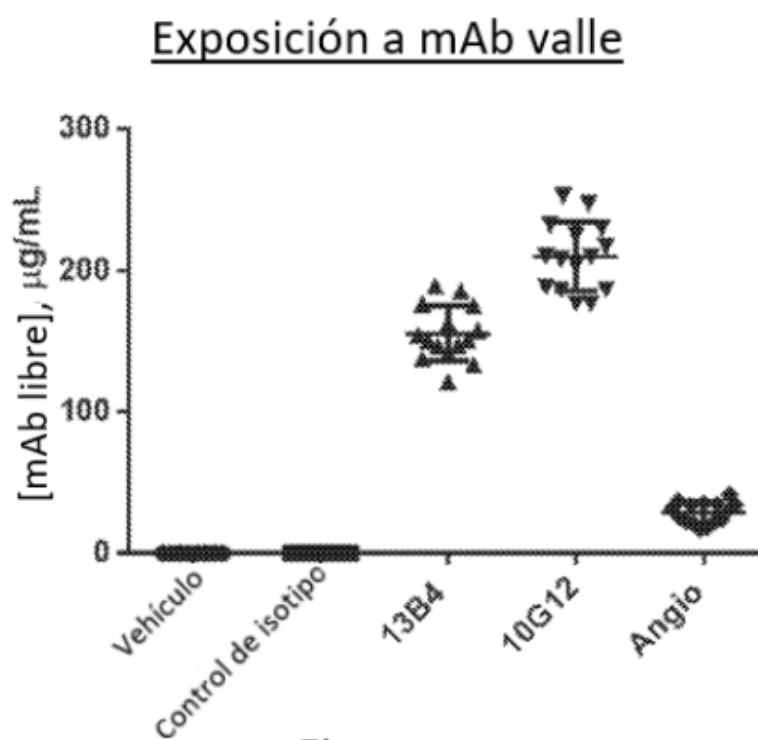


Figura2B



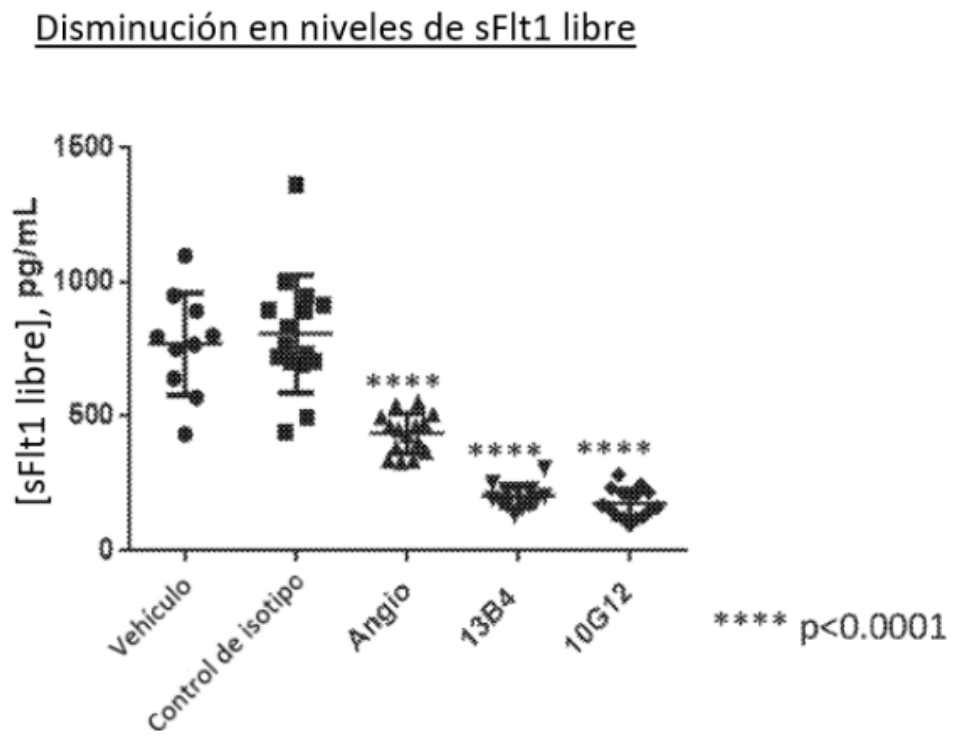
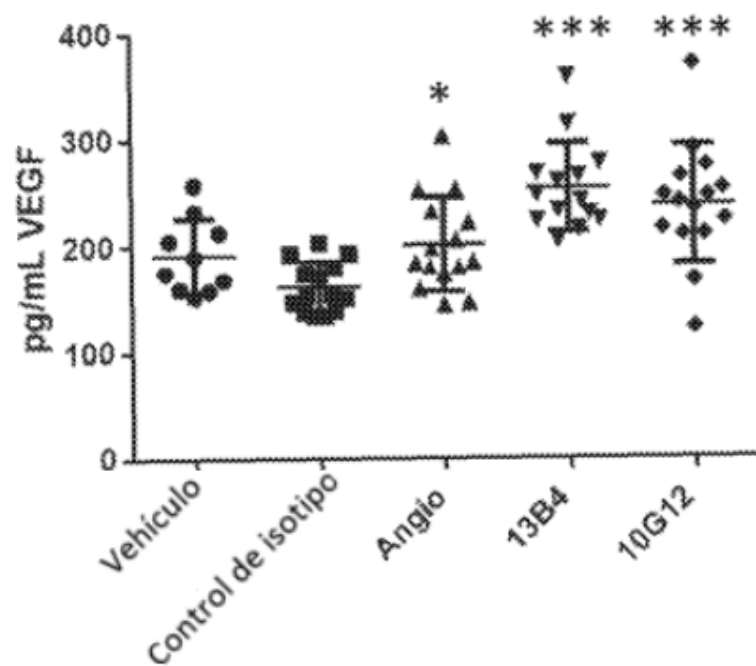


Figura 3

### Aumento de niveles de VEGF

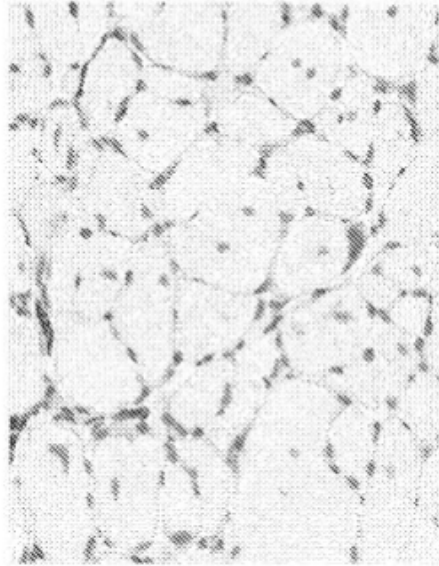


\* Angio vs. isotipo  $p < 0,05$

\*\*\* 13B4/10G12 vs. isotipo  $p < 0,001$

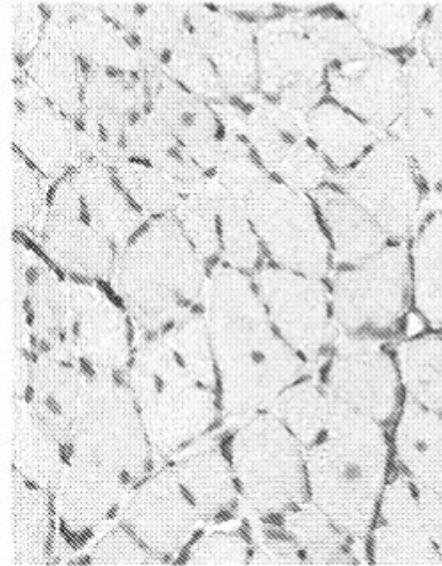
Figura4

**Control de isotipo**



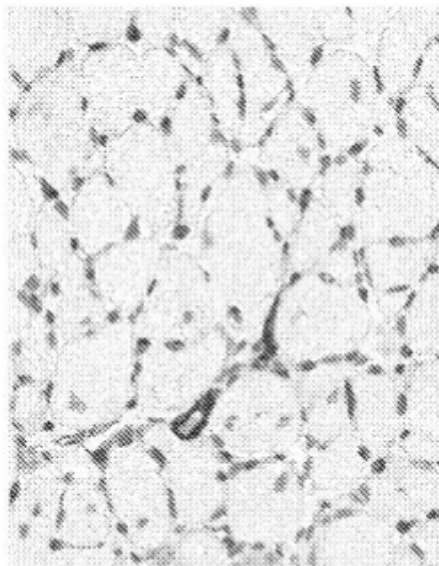
**Figura 5A**

**Control comercial Ab**



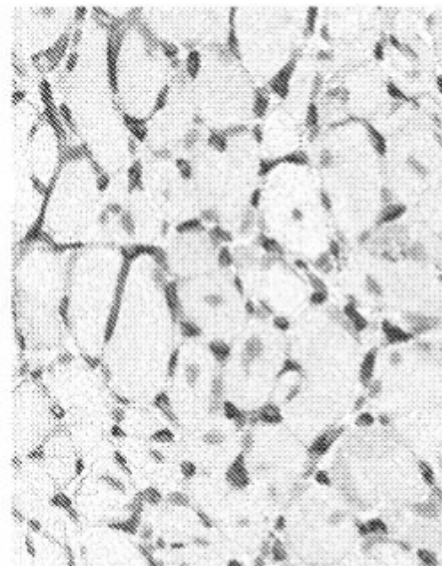
**Figura 5B**

**13B4**



**Figura 5C**

**10G12**



**Figura 5D**

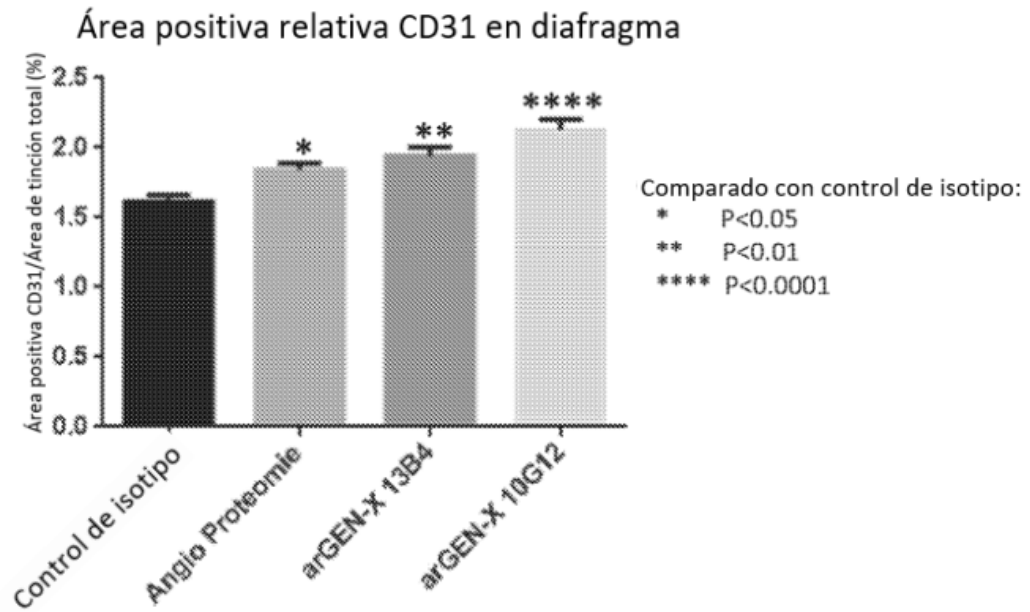


Figura 6A

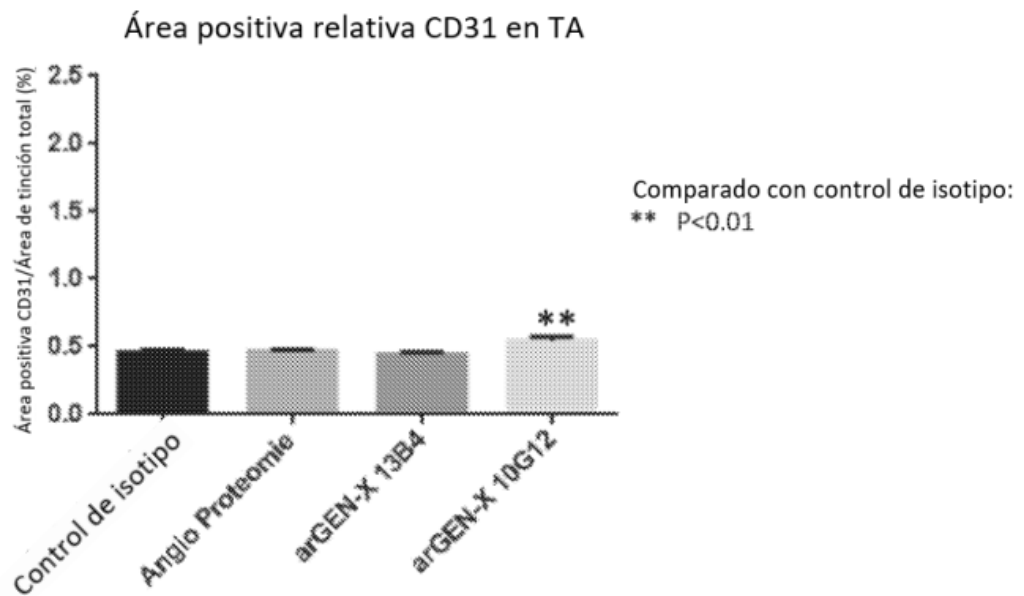


Figura 6B

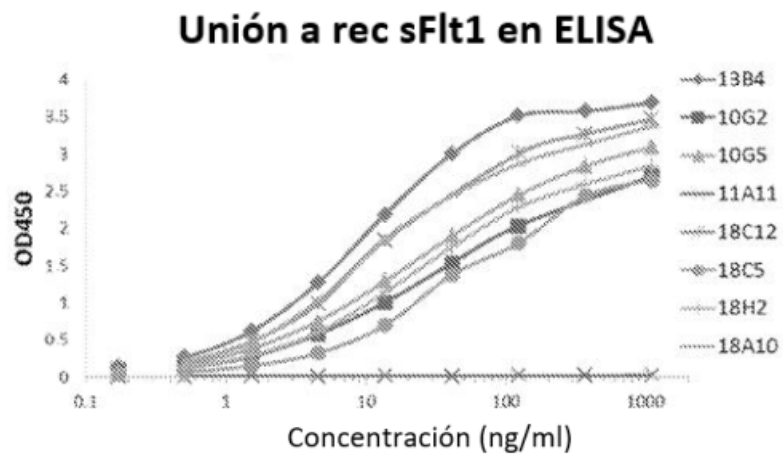


Figura 7

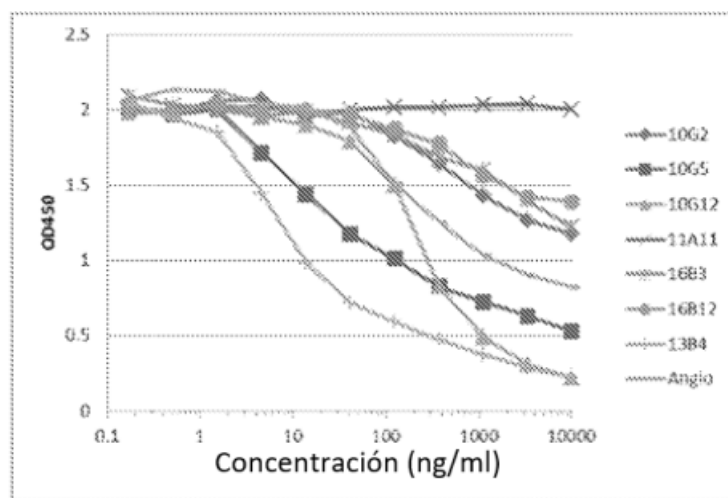


Figura 8

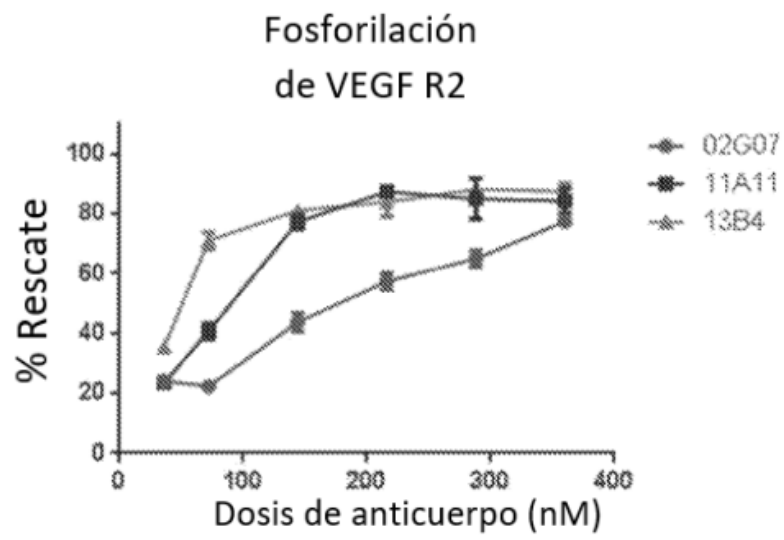


Figura 9

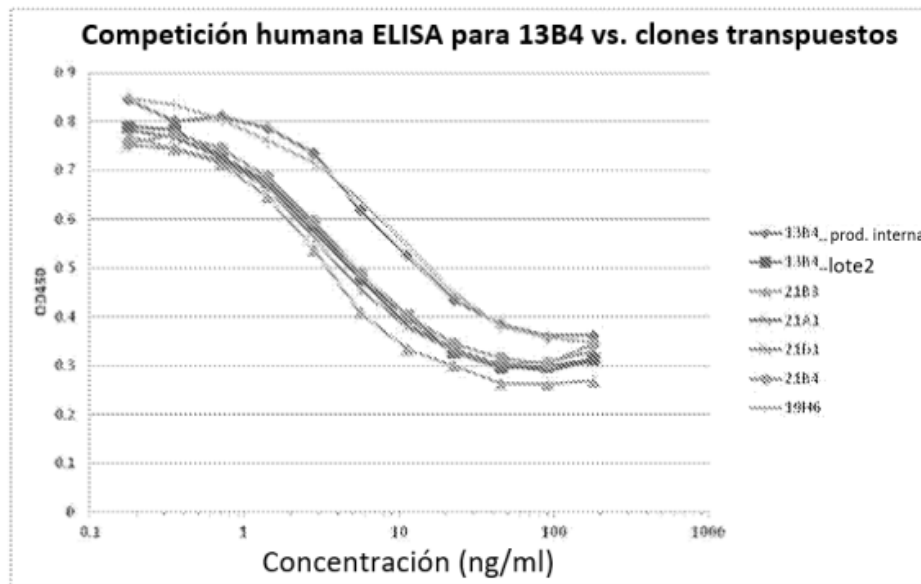


Figura 10



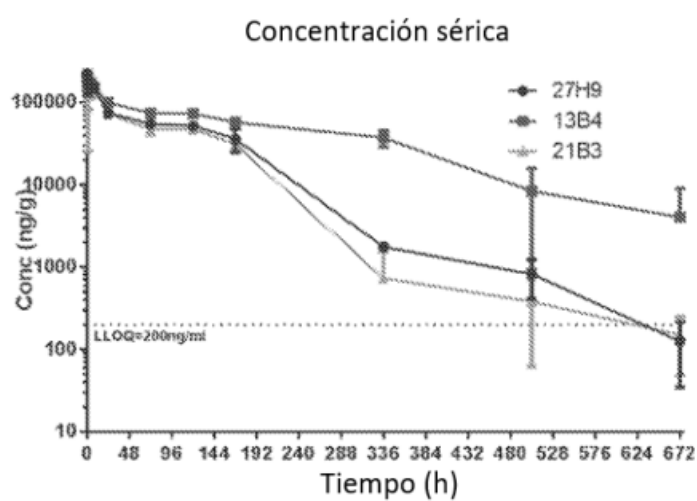
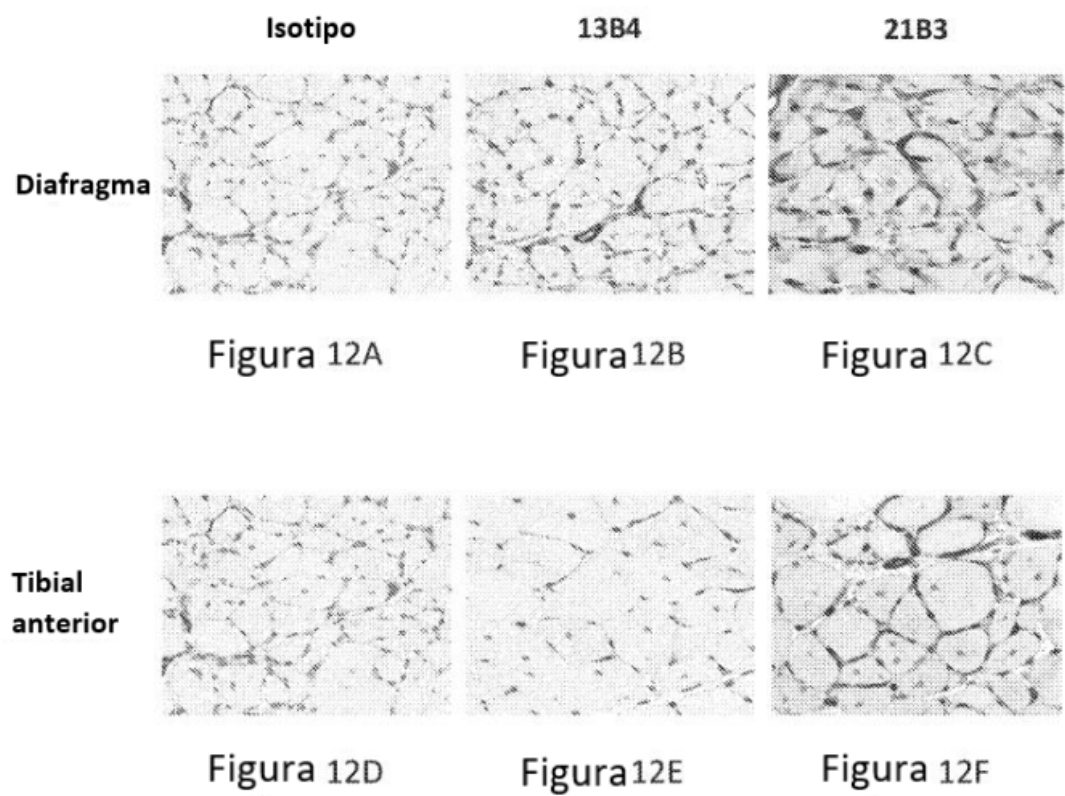


Figura 11



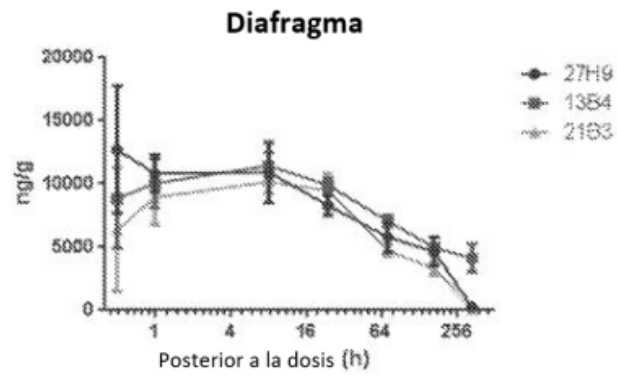


Figura 13A

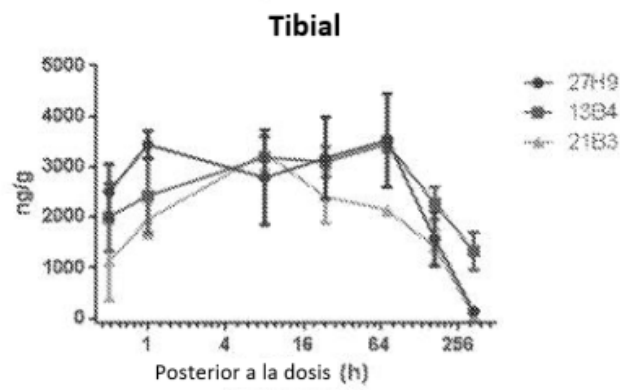


Figura 13B

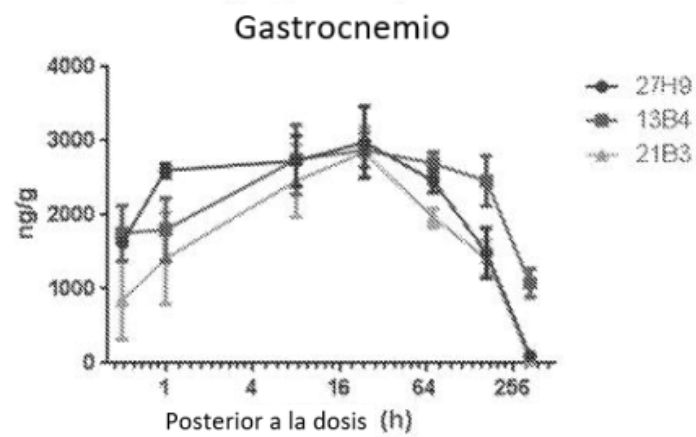
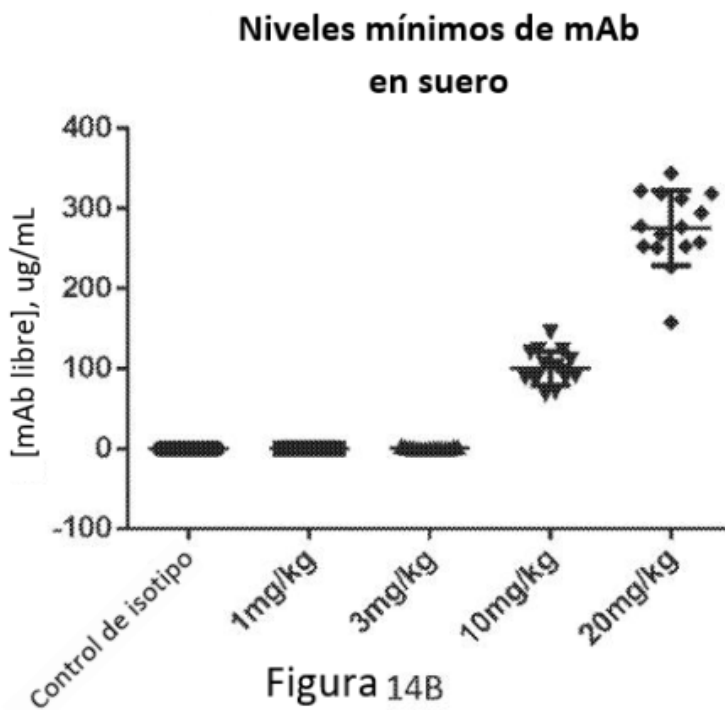
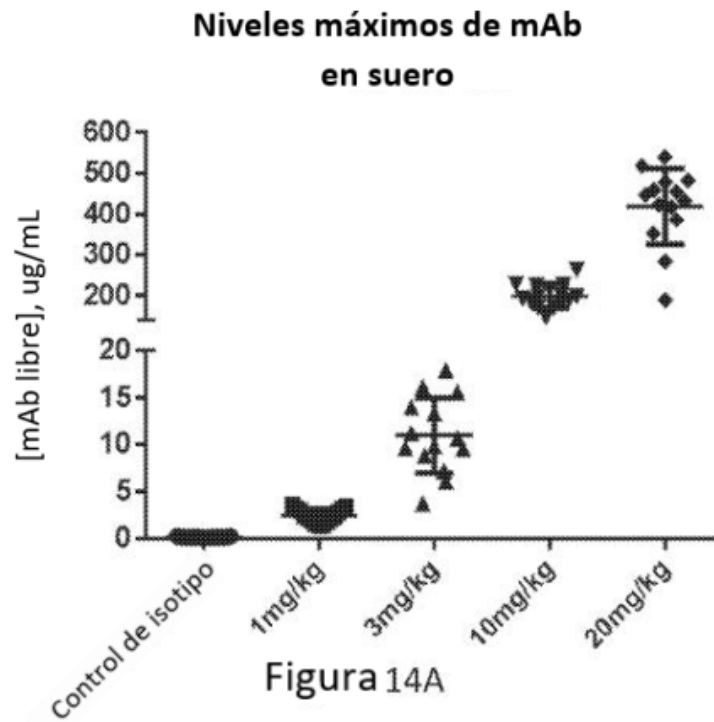


Figura 13C



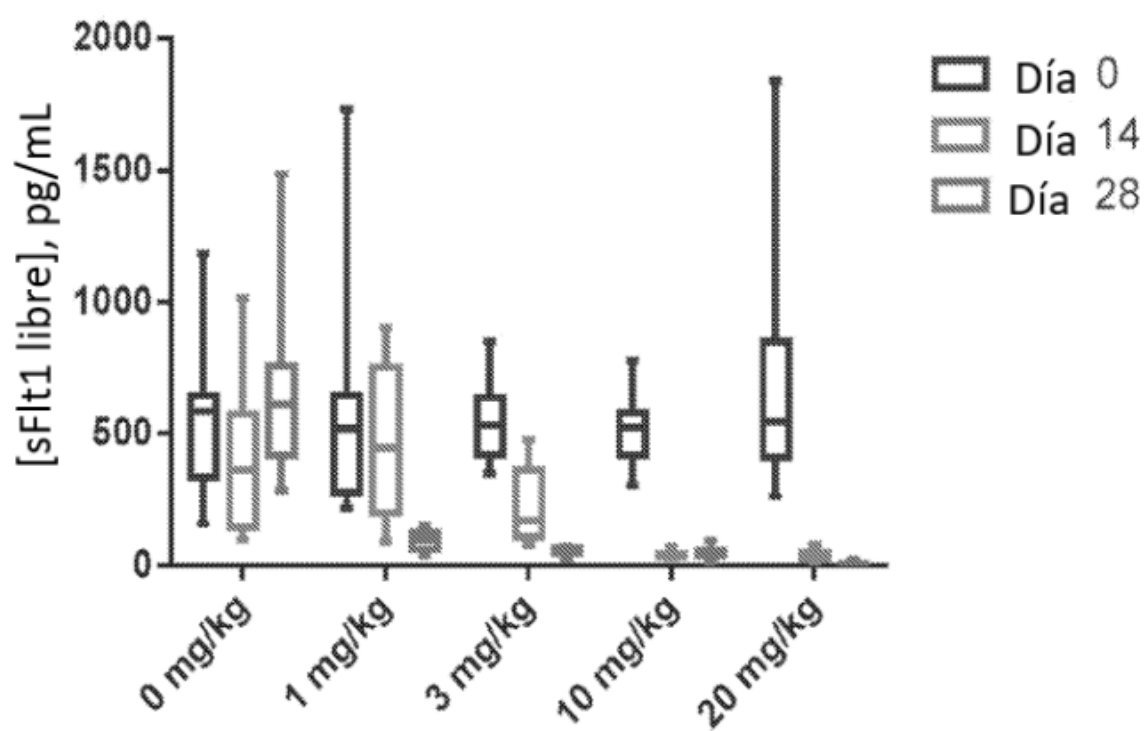


Figura 15

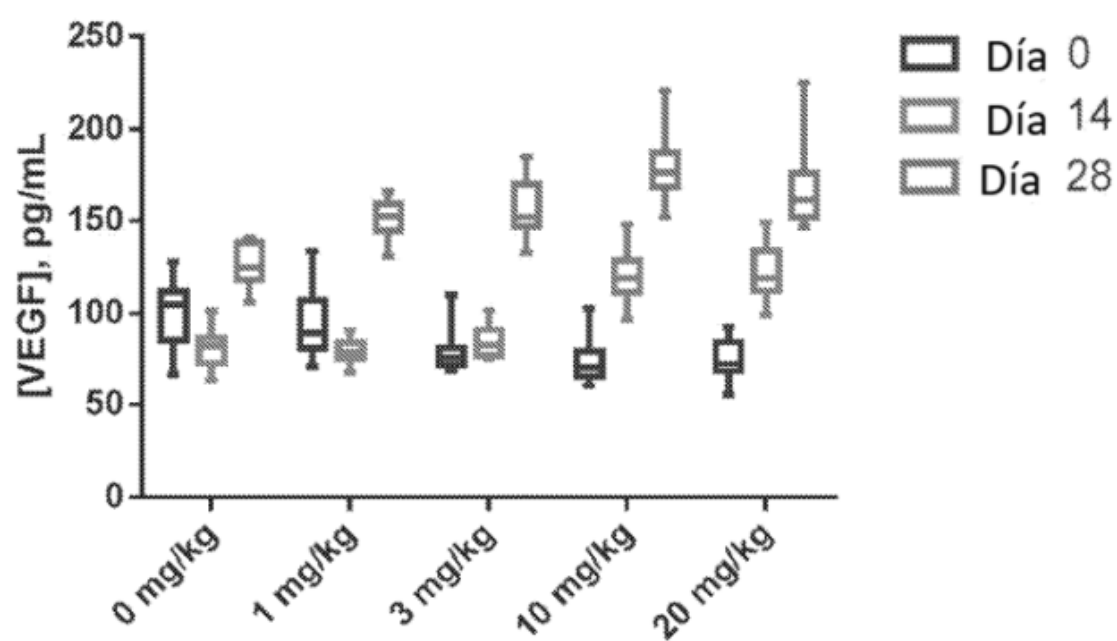


Figura 16

Control de isotipo

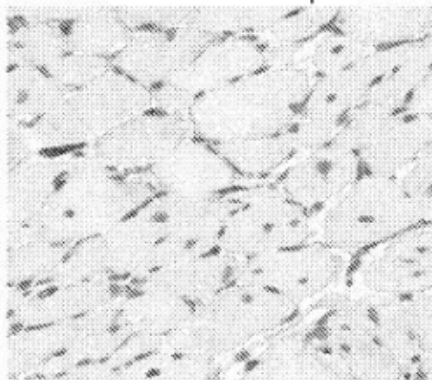


Figura 17A

21B3 1mg/kg

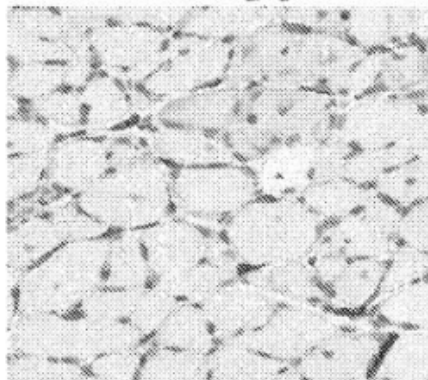


Figura 17B

21B3 3mg/kg

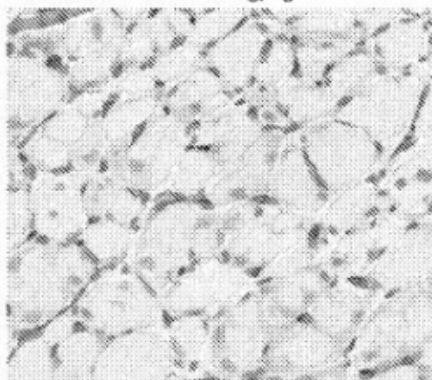


Figura 17C

21B3 10mg/kg

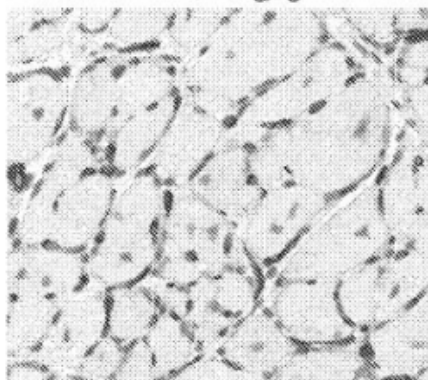


Figura 17D

21B3 20mg/kg

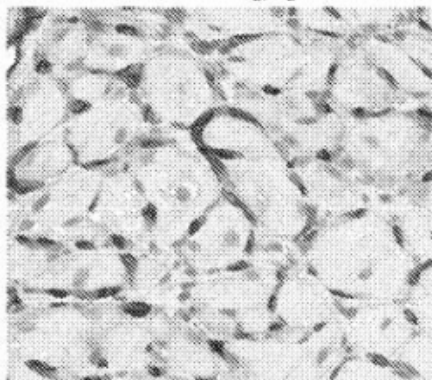


Figura 17E

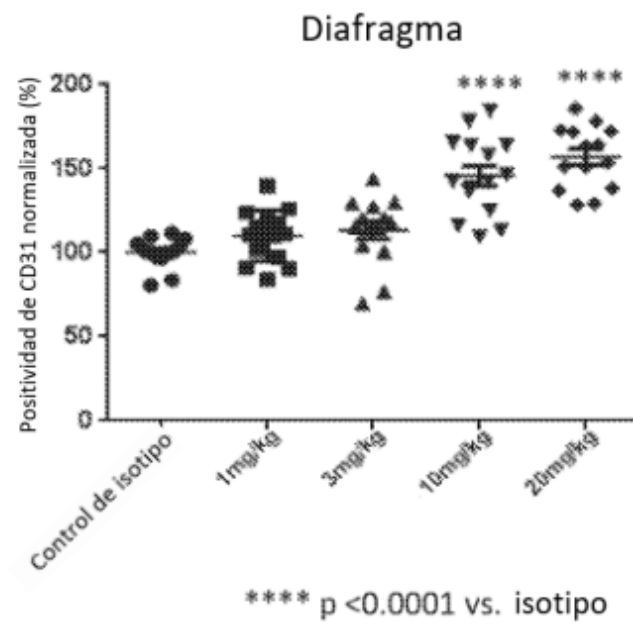


Figura 18



Control de isotipo

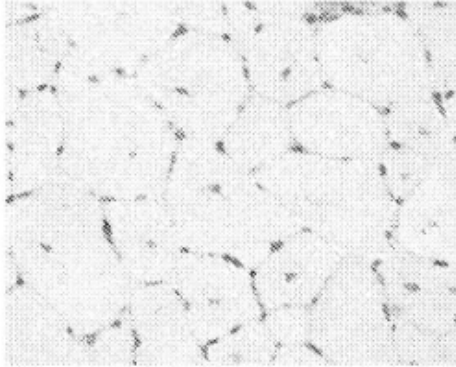


Figura 19A

21B3 1mg/kg

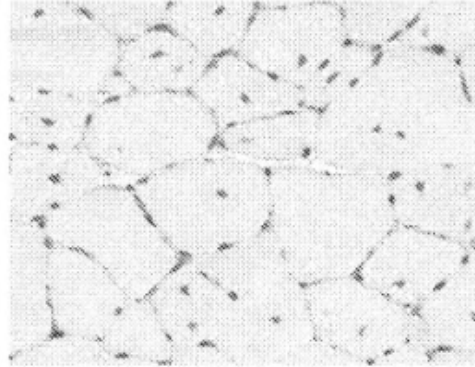


Figura 19B

21B3 3mg/kg

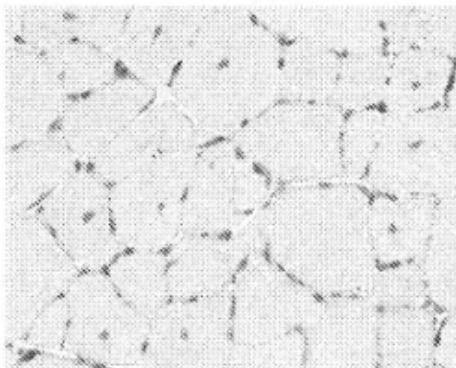


Figura 19C

21B3 10mg/kg

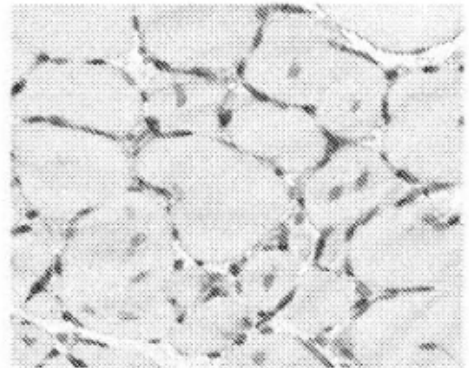


Figura 19D

21B3 20mg/kg

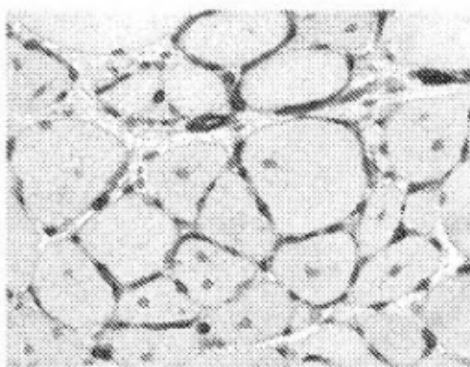


Figura 19E

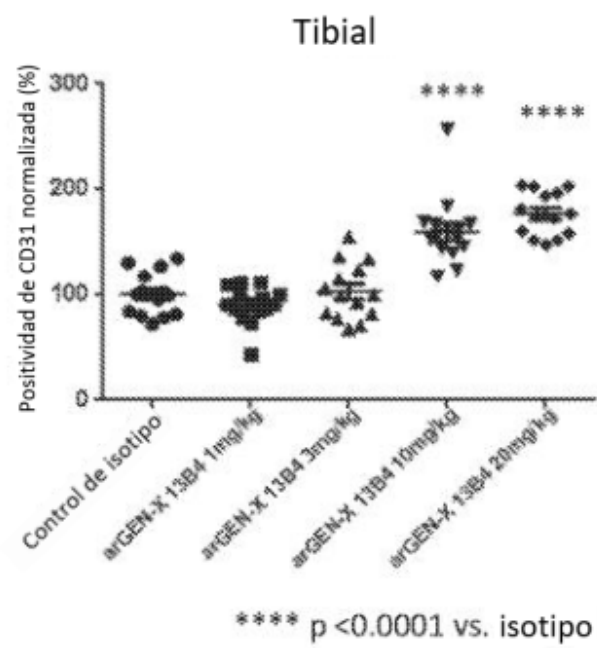


Figura 20

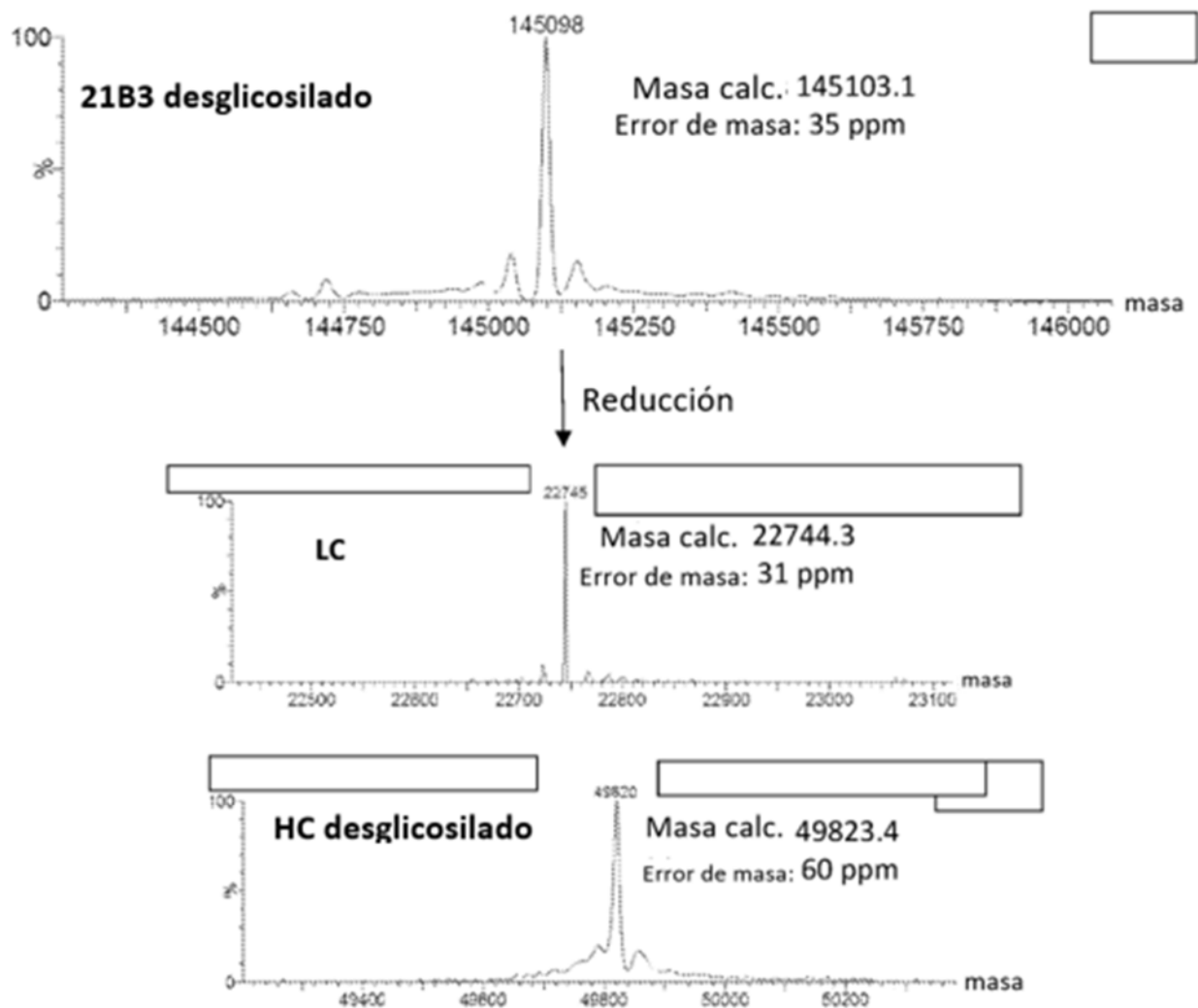


Figura 21A

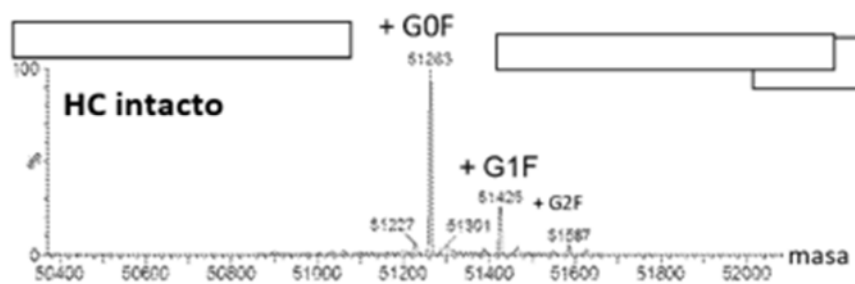


Figura 21B

Ensayo basado en células VEGF:sFlt1

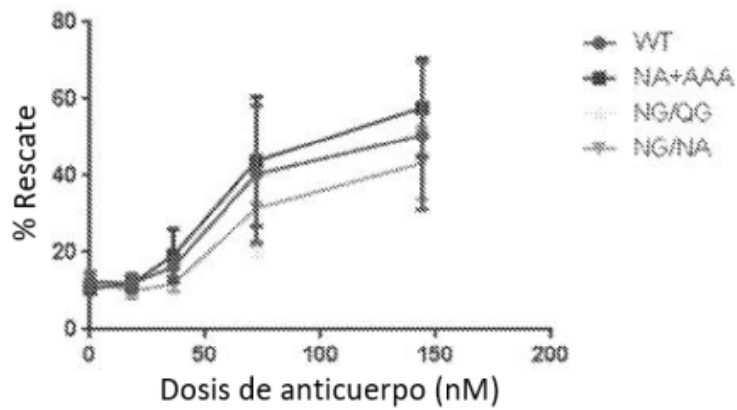


Figura 22A

Ensayo basado en células VEGF:sFlt1

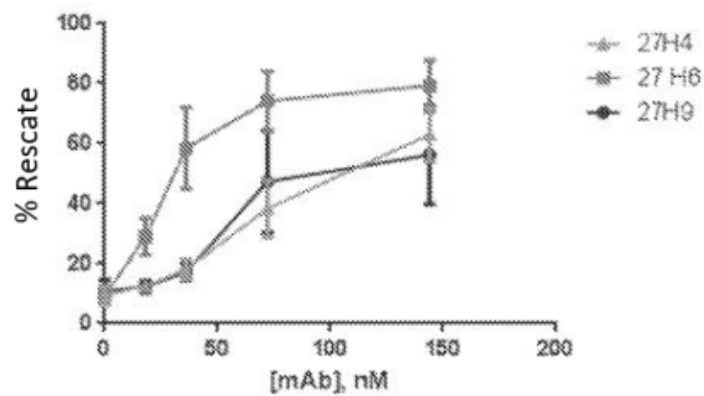


Figura 22B

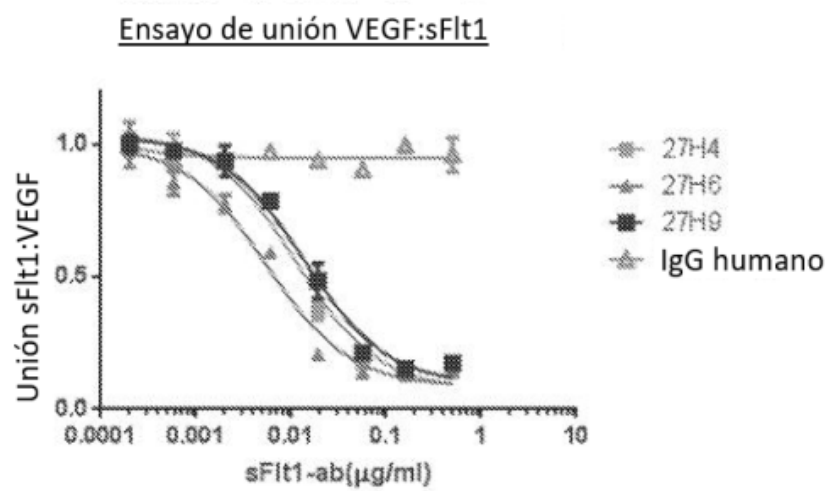


Figura 23

### Fármaco libre

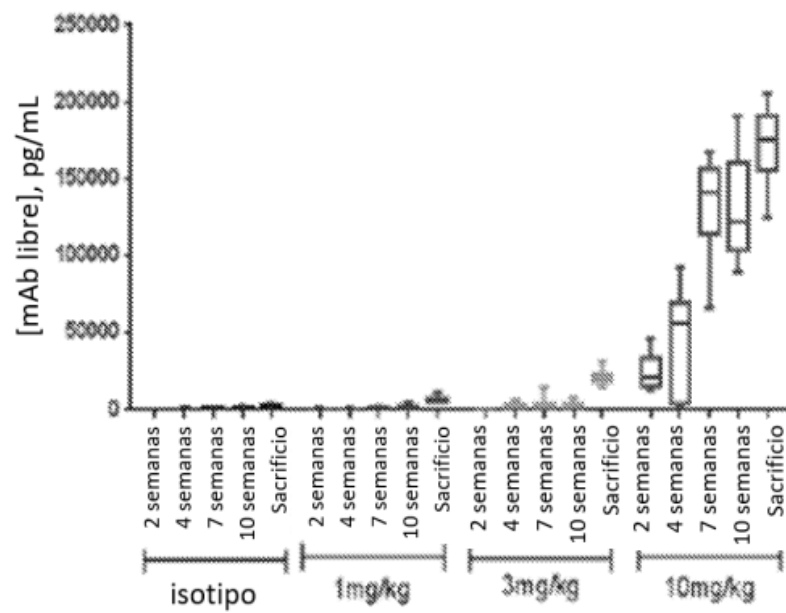


Figura 24

Objetivo libre

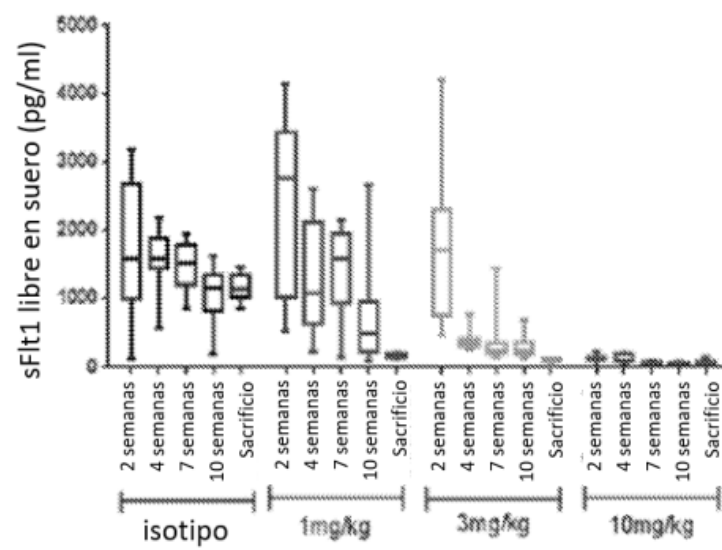


Figura 25

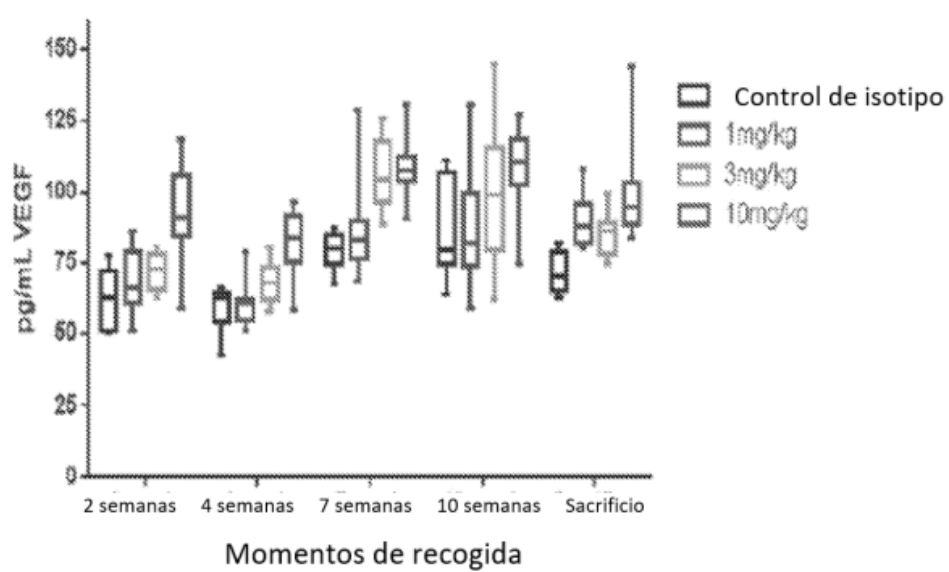
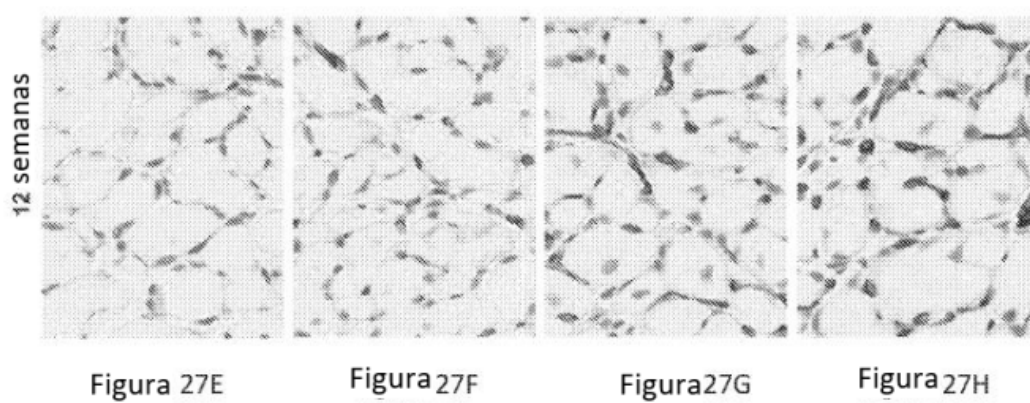
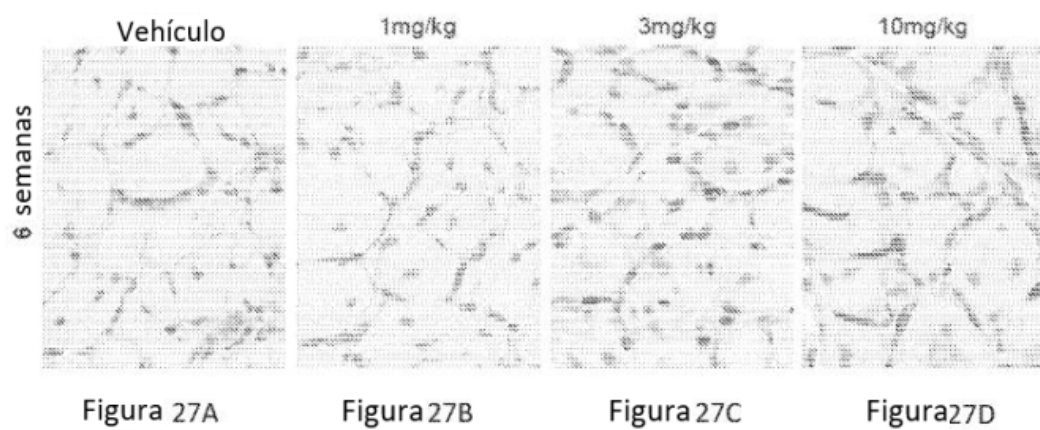
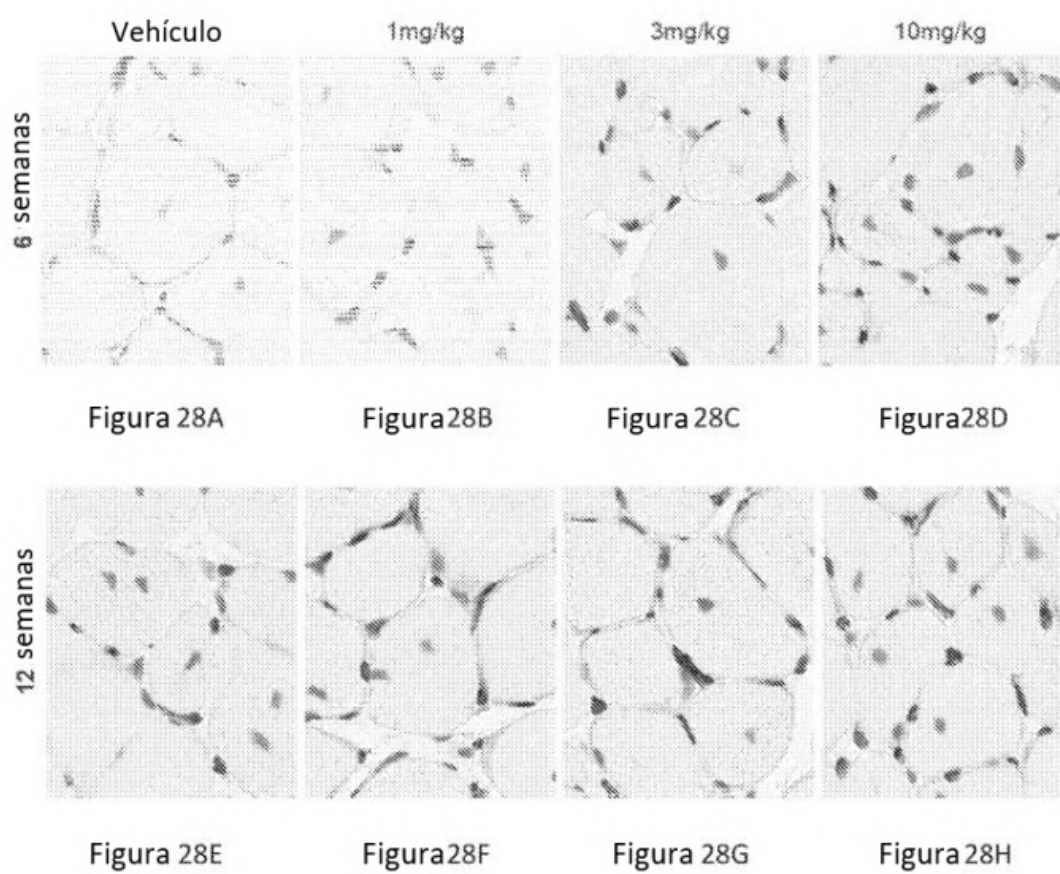
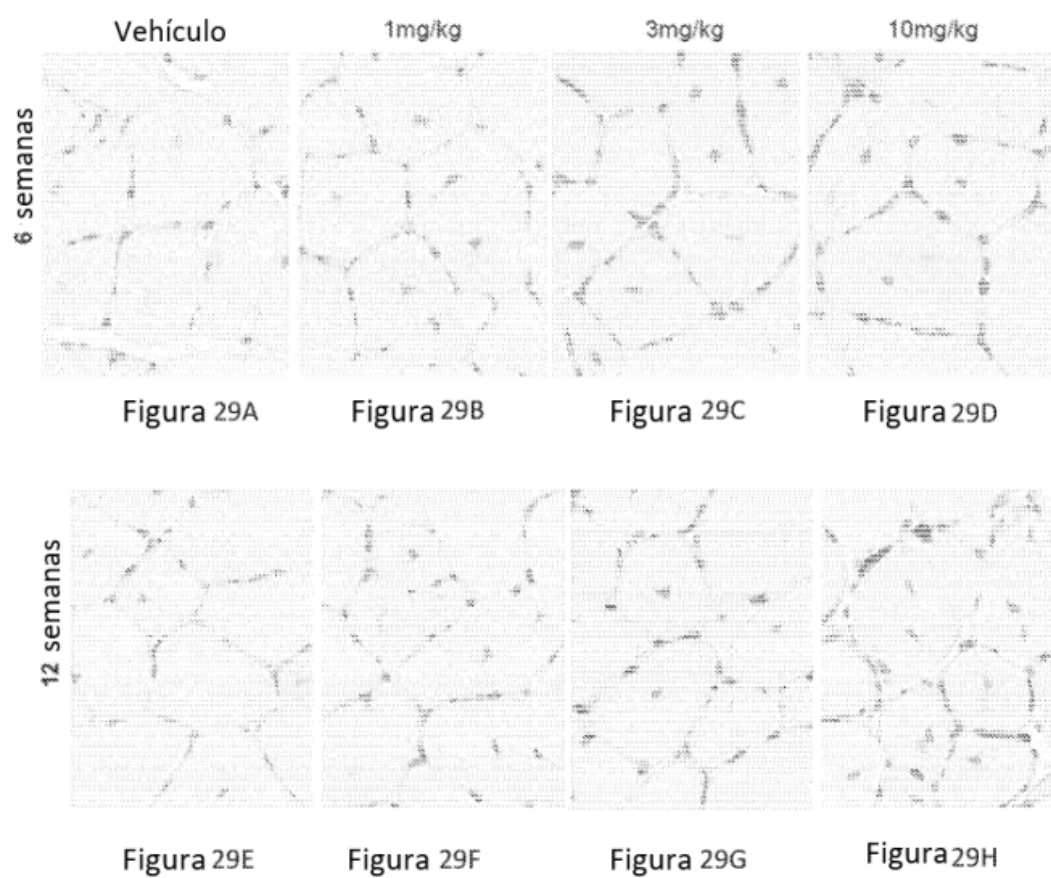


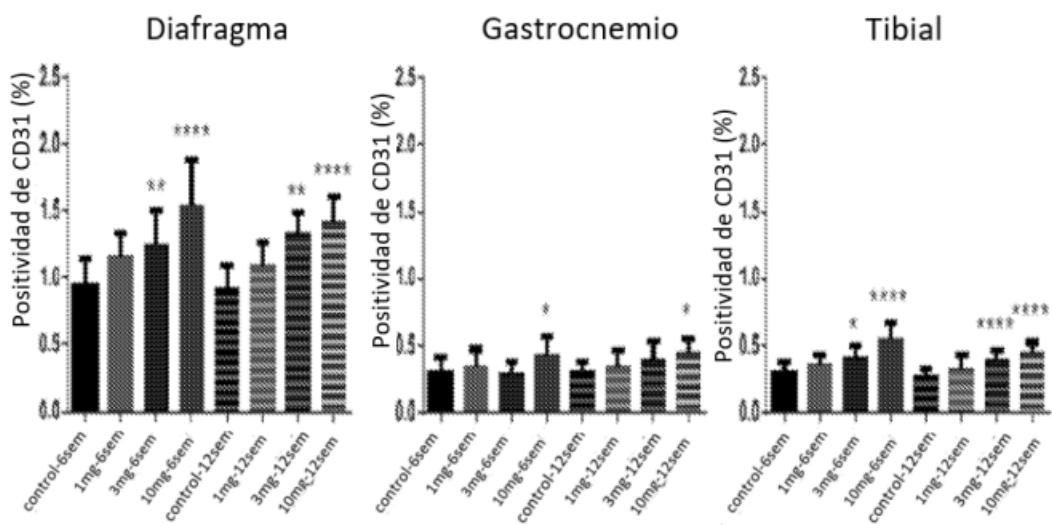
Figura 26











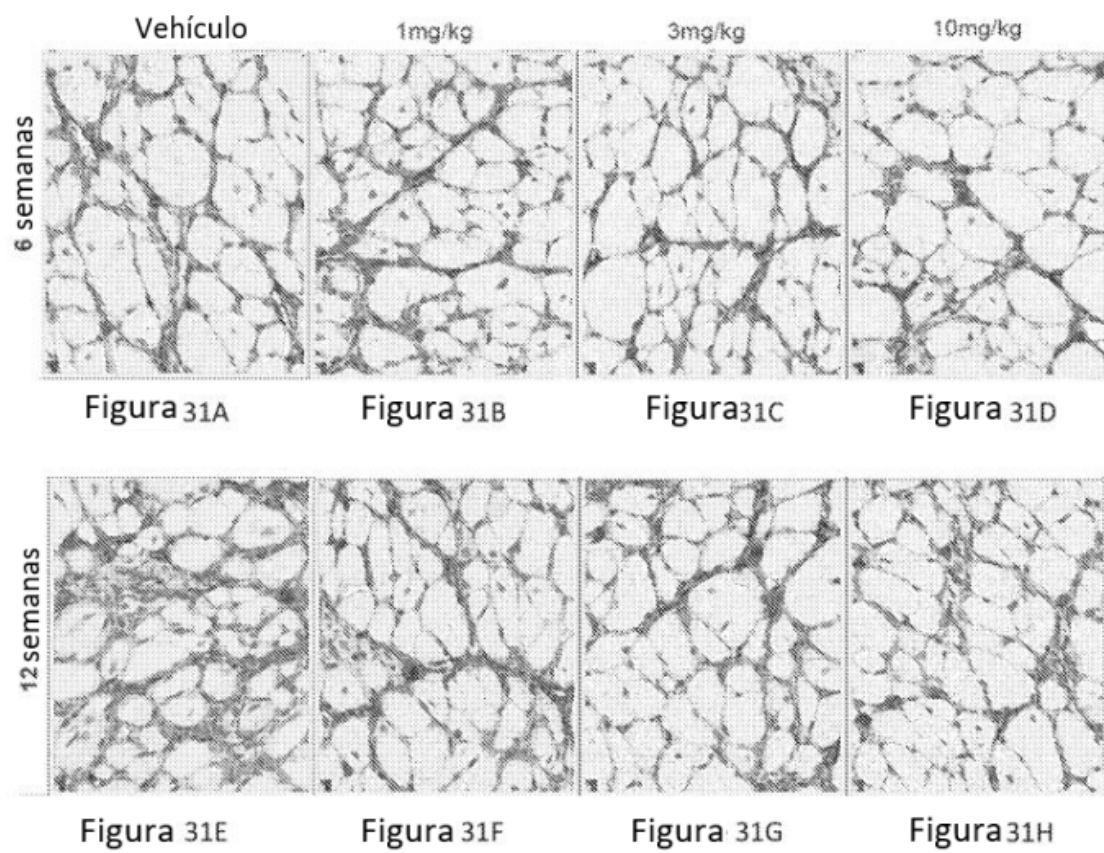
Comparado con controles de isotipo:

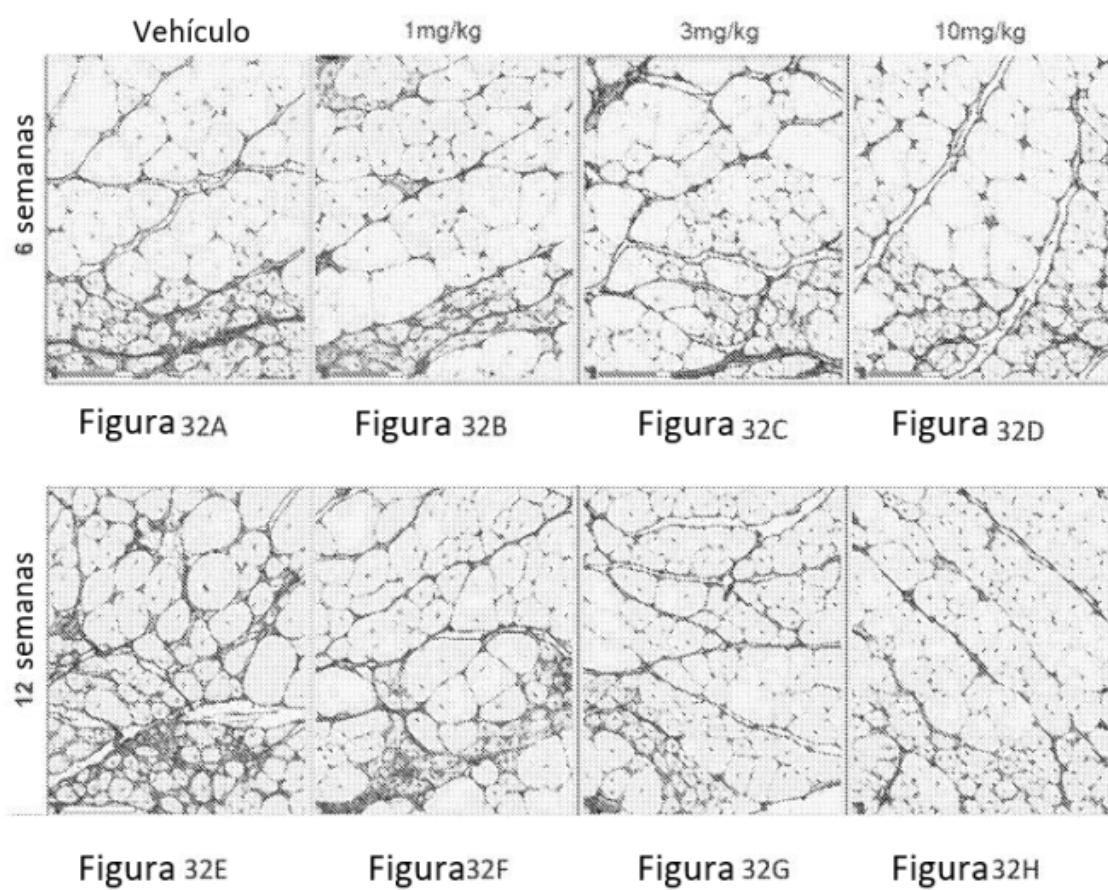
\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$

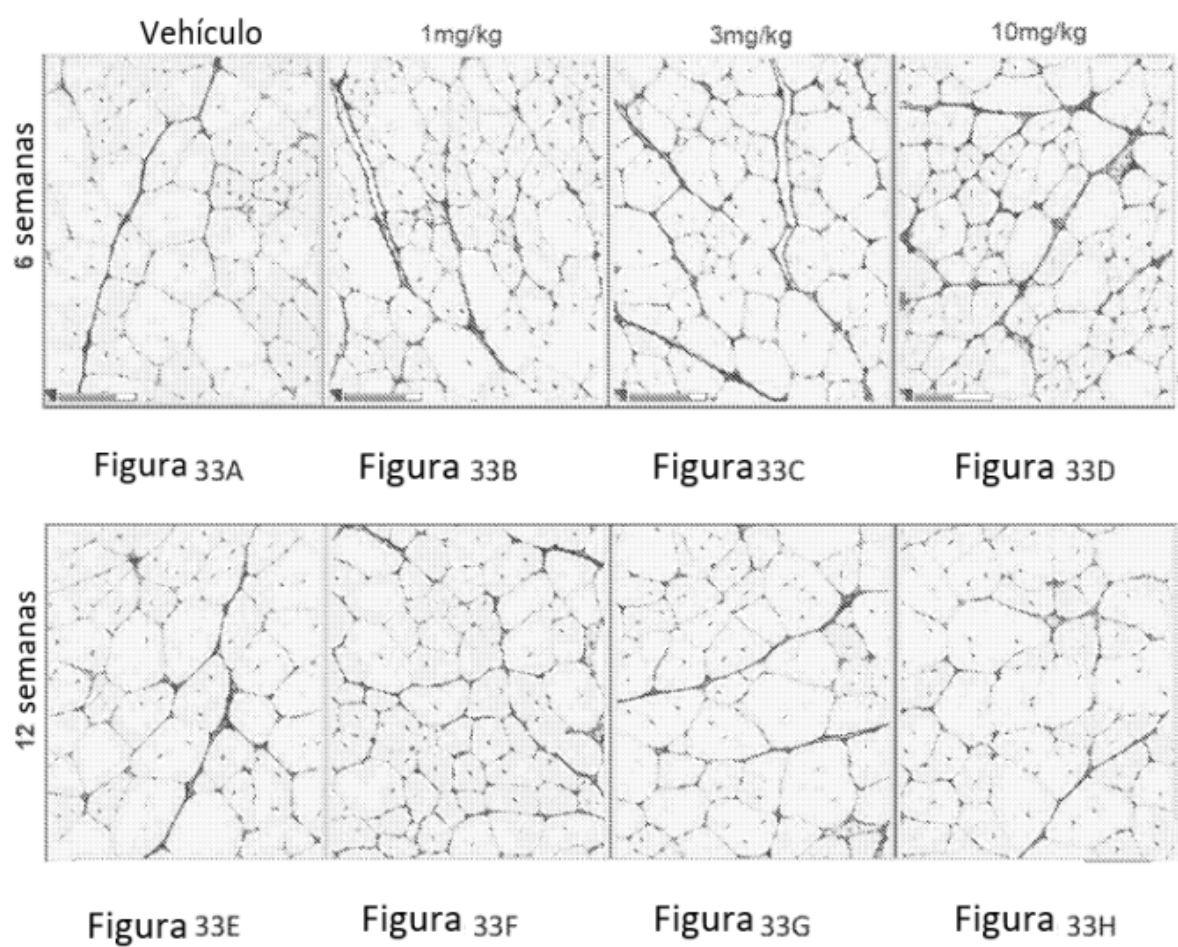
Figura 30B

Figura 30C

Figura 30A







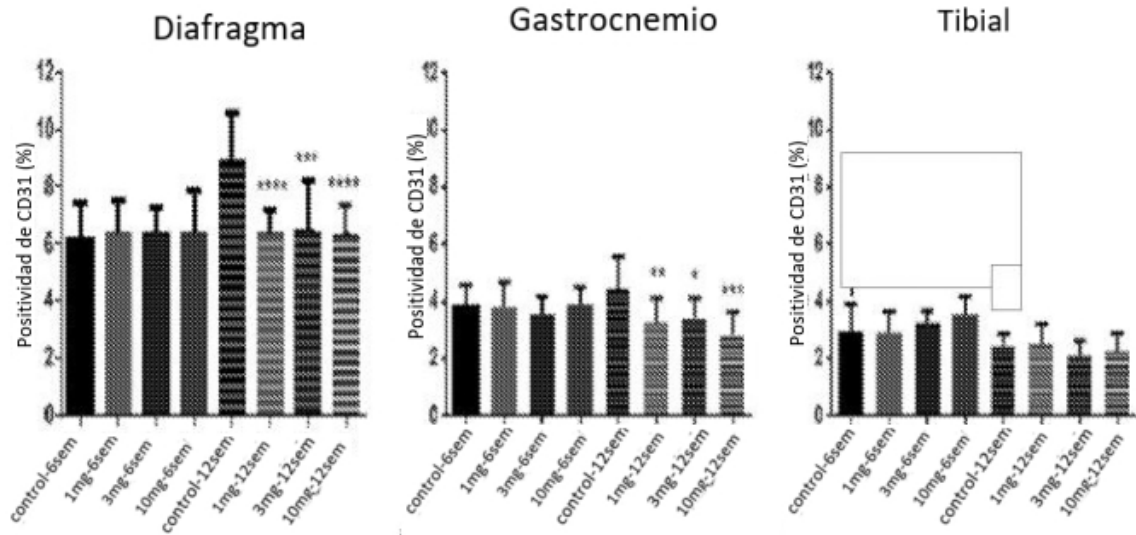


Figura34A

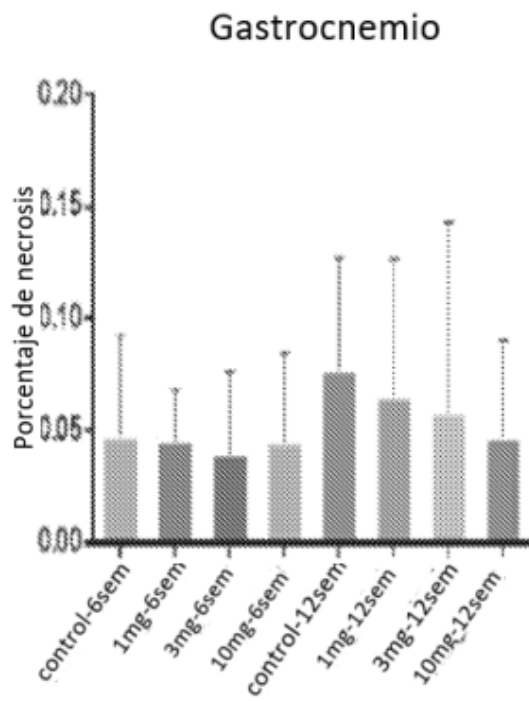
Figura34B

Figura 34C

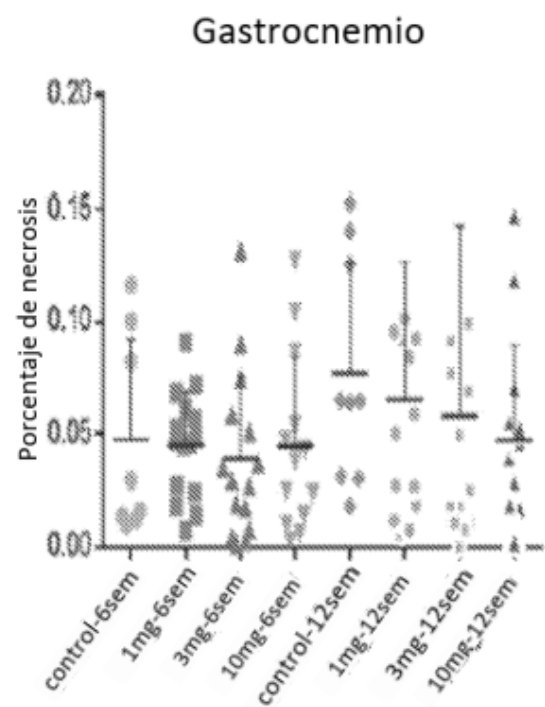
Comparado con controles de isotipo:

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; \*\*\*\*P<0.0001





**Figura 35A**



**Figura 35B**





Figura37

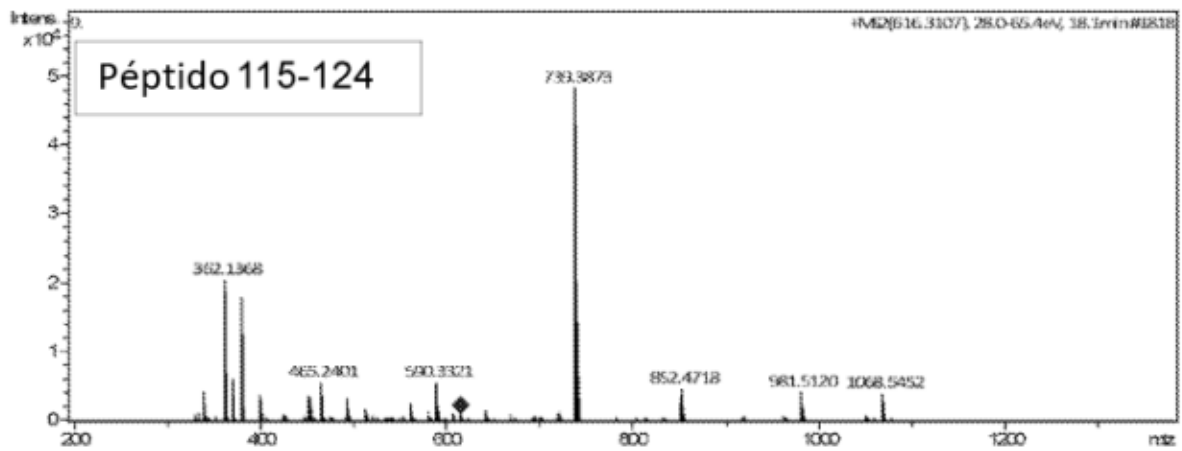


Figura 38A

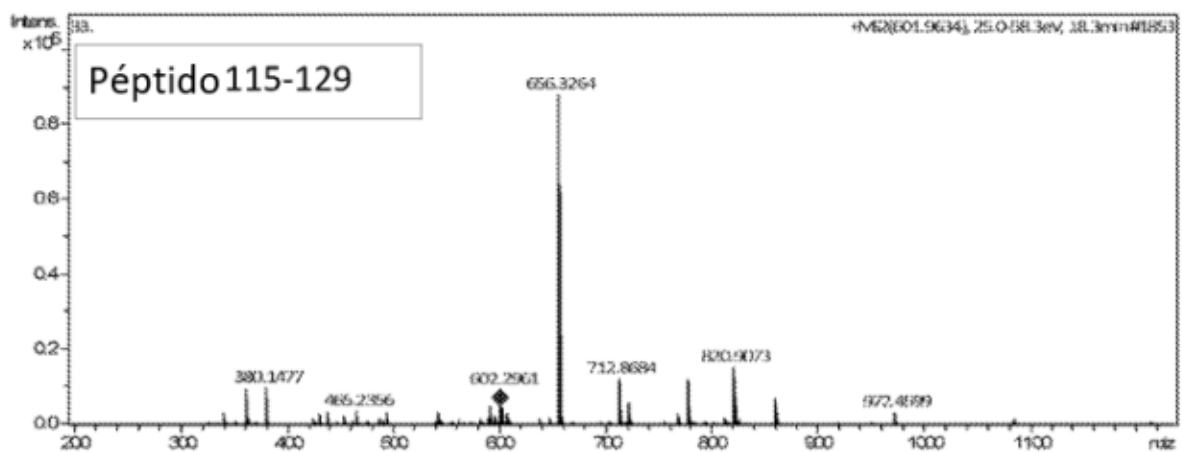


Figura 38B

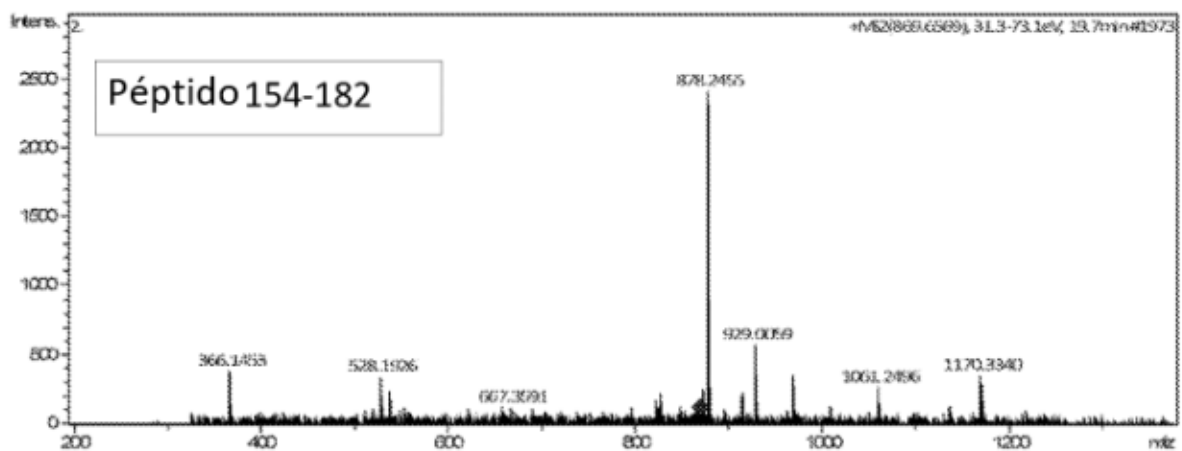


Figura 38C

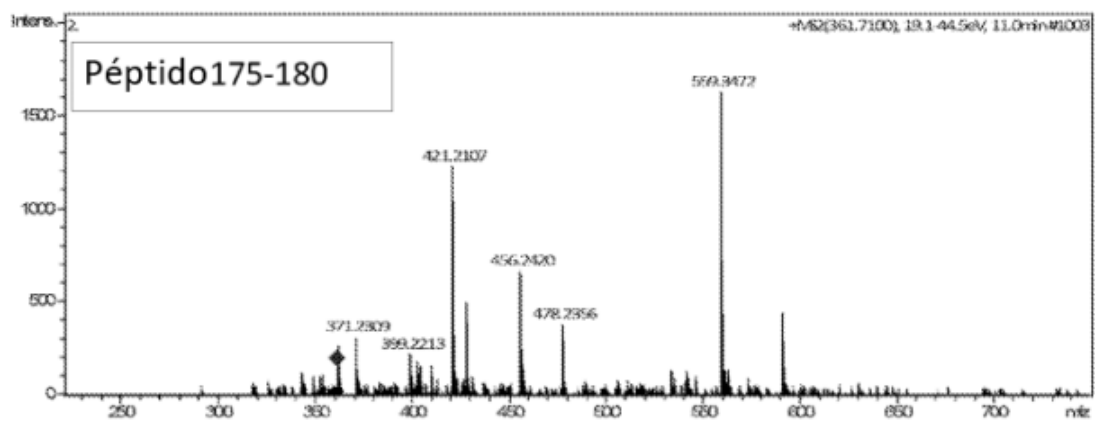


Figura 38D

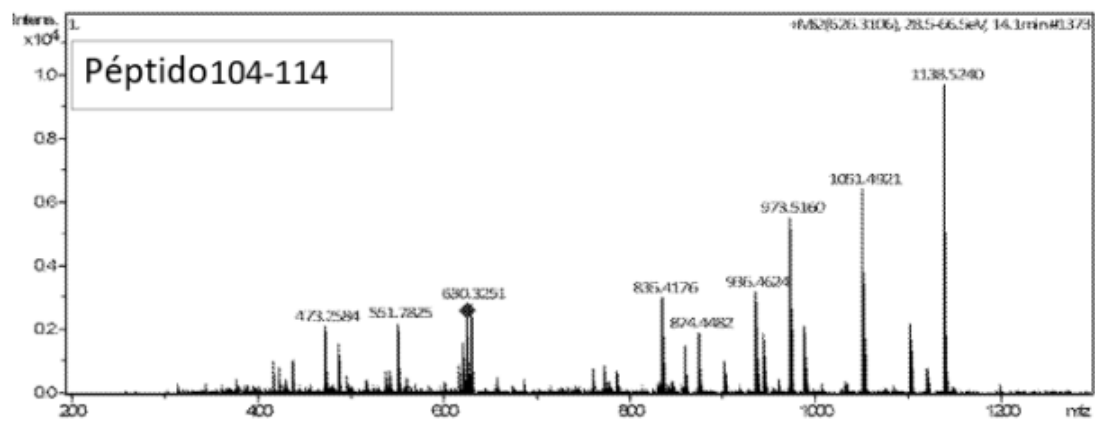


Figura 38E