



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 609**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03778499 .8**

96 Fecha de presentación : **20.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1565491**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54

Título: **Anticuerpos ligantes al Magic Roundabout (MR) humano, polipéptidos y su uso para la inhibición de angiogénesis.**

30

Prioridad: **20.11.2002 GB 0227080**
12.09.2003 GB 0321401

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73

Titular/es: **Cancer Research Technology Limited**
Sardinia House, Sardinia Street
London WC2A 3NL, GB

72

Inventor/es: **Bicknell, Roy;**
Suchting, Steven y
Stewart, Lorna Mary Dyet

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 357 609 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 ligantes al Magic Roundabout (MR) humano, polipéptidos y su uso para la inhibición de angiogénesis.

5 La presente invención se refiere a anticuerpos y polipéptidos, y en particular a los anticuerpos y polipéptidos ECSM4 que inhiben los angiogénesis y su uso para ello.

10 Las células endoteliales forman una única capa celular que reviste todos los vasos sanguíneos y regula los intercambios entre la corriente sanguínea y los tejidos circundantes. Nuevos vasos sanguíneos se desarrollan desde las paredes de pequeños vasos ya existentes por la protuberancia de estas células endoteliales que tienen la capacidad de formar tubos capilares huecos incluso cuando aisladas en cultivo. *In vivo*, los tejidos deteriorados y algunos tumores atraen un abastecimiento de sangre segregando factores que estimulan las células endoteliales cercanas a que construyan nuevos brotes capilares. Los tumores que no logran atraer un abastecimiento de sangre están severamente limitados en su crecimiento.

15 El proceso por el cual se originan nuevos vasos como capilares, creciendo desde pequeños vasos ya existentes, se llama angiogénesis. Por consiguiente, se puede notar que la angiogénesis desempeña un papel importante en el crecimiento y la reparación normal del tejido y en la evolución de varias condiciones patológicas.

20 Una vez que el sistema vascular está totalmente desarrollado, las células endoteliales de los vasos sanguíneos se suelen mantener inactivas, con ninguna nueva formación de vasos, con la excepción de la formación de nuevos vasos sanguíneos en caso de la curación normal de heridas. Sin embargo, una desregulación en el crecimiento de un vaso sanguíneo y un incremento anormal de la densidad del vaso puede suceder en enfermedades o condiciones tales como tumorigénesis, retinopatía diabética, psoriasis e inflamación. Por consiguiente, la aptitud para inhibir angiogénesis inapropiada o indeseable puede ser útil en el tratamiento de estas enfermedades o condiciones.

25 El anticuerpo Magic Roundabout humano (MR también conocido como molécula específica 4 de célula endotelial, ECSM4) demostró anteriormente que tiene un perfil de expresión selectiva alta de célula endotelial (Huminiński y Bicknell 2000), *Genome research*, 10, 1796-1808; y WO 02/36771). Se demostró que la expresión MR *in vivo* está restringida a lugares de angiogénesis activa, en particular en los vasos con tumor. (Huminiński *et al.* (2002) *Genomics*, 79(4), 547-552).

30 Basado en esta información, se sugirió en WO 02/36711 que los compuestos incluyendo una fracción que liga el MR, tal como un anticuerpo, y una fracción funcional más, pueden ser útiles para una variedad de objetivos médicos incluyendo representar mediante imagen el epitelio vascular, diagnosticar o pronosticar una condición involucrando el epitelio vascular; evaluar la eficacia de terapias anti-angiogénicas; detectar daño endotelial; detectar un tumor o neovascularización tumoral o enfermedad cardíaca o endometriosis o aterosclerosis; tratar una enfermedad proliferativa que afecta al endotelio vascular tal como cáncer, psoriasis, retinopatía diabética, arterosclerosis o menorragia; introducir material genético en las células endoteliales vasculares; y modular la angiogénesis.

35 Por ejemplo, WO 02/36771 enseña un compuesto que comprende una fracción que liga al MR, tal como un anticuerpo, y una fracción más tal como un inhibidor de angiogénesis (página 27). WO 02/36771 enseña también un compuesto incluyendo una fracción que liga a MR, tal como un anticuerpo, y una fracción más tal como una fracción citotóxica que destruye o retrasa o da marcha atrás al crecimiento de la neovascularización. (página 35).

40 Sin embargo, en cada caso, la fracción que liga a MR conduce sencillamente la fracción funcional a una localización endotelial deseada para su uso. WO 02/36771 no propone que la fracción que liga a MR sea ella misma funcional, ni menos que inhiba el MR o pueda ser utilizada para inhibir la angiogénesis.

45 Ahora, hemos demostrado que un anticuerpo que se liga selectivamente a la región extracelular de MR resulta en una inhibición de angiogénesis.

50 En el párrafo que comprende las páginas 71-72, WO 02/36771 expone que ambos anticuerpos que estimulan o activan MR y anticuerpos que evitan estimulación y activación de MR podrían ser utilizados para modular la angiogénesis. Sin embargo, esto no propone que un anticuerpo que selectivamente liga a la región extracelular de MR pueda ser utilizado para inhibir angiogénesis. Además, en el mejor conocimiento de la invención, ni WO 02/36771, ni otro documento prueban que un anticuerpo que liga selectivamente a la región extracelular de MR, de hecho inhibe la angiogénesis.

55 De este modo se ha facilitado conforme a un primer aspecto de la invención el uso de un anticuerpo que liga selectivamente a residuos 46-209 de un Magic Roundabout (MR) humano en la preparación de un medicamento para inhibir angiogénesis.

60 Con "Inhibir angiogénesis" entendemos la reducción de la tasa o nivel de angiogénesis. La reducción puede ser de un bajo nivel alrededor de 10%, o alrededor de 20%, o de 30%, o de 40% de la tasa o nivel de angiogénesis. De manera preferible, la reducción es de nivel medio de un 50%, o de 60%, o de 70%, o de 80% de la tasa o del nivel de la angiogénesis. De manera más preferible, la reducción es de un alto nivel de un 90%, o de un 95%, o de un 99%, o de un 99,9%, o de un 99,99% de la tasa o del nivel de la angiogénesis. De la manera más preferible, la inhibición también puede incluir la eliminación de angiogénesis o su reducción a un nivel indetectable.

ES 2 357 609 T3

Los métodos y pruebas para determinar la tasa o el nivel de angiogénesis, y por lo tanto para determinar si y en qué alcance un anticuerpo inhibe la angiogénesis, son conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo la patente estadounidense No. 6, 225,118 B1 a *Grant et al* describe una prueba multicelular *in vitro* para modelar las etapas combinadas de la angiogénesis, en concreto las etapas de proliferación, migración, y diferenciación del desarrollo de una célula.

10 El angioKit, catálogo No. ZHA-1000, de TCS Cell Works Ltd, Buckingham, MK 18 2LR, UK, es un modelo de angiogénesis humana adecuado para analizar las propiedades angiogénicas o anti-angiogénicas de los compuestos de ensayo.

La tasa o el nivel de angiogénesis también puede ser determinado usando la prueba del anillo aórtico descrita en el ejemplo 2.

15 De manera preferible, el anticuerpo inhibe también el angiogénesis *in vivo*, especialmente en los mamíferos, y más preferible en los humanos.

20 Con MR, incluimos el producto genético del gen Mágico Roundabout Humano (también conocido como ECSM4) y las variantes que ocurren naturalmente. El cDNA y la secuencia aminoácida del MR se encuentran en Genbank Accession Nos. AF361473 y AAL31867 y se pueden ver en la figura 1 (SEQ ID Nos: 1 y 2, respectivamente).

25 MR es una proteína transmembrana y ha sido pronosticado que tiene una región extracelular en residuos 1-467 (SEQ ID NO: 3), una región transmembrana en residuos 468-490 y una región intracelular en residuos 491-1007 (Huminiński *et al.* 2002). La región extracelular de MR tiene una región inmunoglobulina(Ig) en residuos 46-209 (SEQ ID NO: 4), que puede subdefinirse más en un dominio IgA en residuos 46-116 (SEQ ID NO: 5), y un dominio IgB en residuos 151-209 (SEQ ID NO: 6), y dos dominios de fibronectina tipo III en residuos 252-335 (SEQ ID NO: 7), y 347-432 (SEQ ID NO: 8). La numeración de los residuos aminoácidos de MR son los dados en AF 361473, AAL31867 y en la figura 1B.

30 Por un anticuerpo que “liga selectivamente” a un dominio o región específico de MR, tal un dominio Ig, incluimos el sentido que el anticuerpo liga al dominio específico con una mayor afinidad que para cualquier otra región de MR. De manera preferible, el anticuerpo liga al dominio específico de MR con al menos 2, 5, 10, o 50 veces más afinidad que con otra región de MR. De manera más preferible, el anticuerpo liga al dominio específico de MR con al menos 100, 1000, 10000 veces mejor afinidad que con cualquier otra región de MR. Tal vínculo puede ser determinado por 35 métodos muy conocidos en la técnica. De manera preferible, el anticuerpo liga selectivamente a un epítipo dentro de MR y no liga con otros epítipos.

40 De manera preferible, cuando el medicamento es administrado a una persona, el anticuerpo liga con MR en el dominio específico con al menos 2, 5, 10, 50, veces mejor afinidad que con cualquier otra molécula en el individuo.

45 La inhibición de la angiogénesis puede ser útil en combatir cualquier enfermedad o condición implicando angiogénesis no querido, no deseable o inapropiada. Tales condiciones incluyen tumores/cáncer, psoriasis, aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis (ambas inflamatoria y reumatoide), degeneración macular, enfermedad de Paget, retinopatía y sus complicaciones vasculares (incluido proliferativa y prematura, y retinopatía diabética), proliferaciones benignas vasculares, fibrosis, obesidad e inflamación.

50 Con cáncer se incluye el sarcoma de Kaposi, leucemia, linfoma, mieloma, carcinomas (ambos primarios y secundarios (metástasis), tumores vasculares incluyendo hemangioma (ambos capilar y juvenil (infantil)), hemangiomatosis y hemangioblastoma.

Los tumores que pueden ser tratados por los medicamentos de la invención incluyen cualquier tumor que puede ser asociados a la producción de nuevos vasos sanguíneos.

55 La palabra “tumor” tiene que ser comprendida como referente a todo tipo de crecimiento celular neoplástico, incluyendo tumores del pulmón, hígado, células sanguíneas, piel, páncreas, estómago, colon, próstata, útero, seno, ganglios linfáticos y vesícula. Los tumores macizos son especialmente adecuados. Sin embargo, cánceres de la sangre, incluyendo leucemias y linfomas también se cree que implican nueva formación de vasos sanguíneos y pueden ser tratados por los medicamentos de la invención.

60 Por consiguiente, la invención incluye el uso de un anticuerpo que liga selectivamente a los residuos 46-209 del MR en la preparación de un medicamento para combatir una enfermedad o condición seleccionada de tumores/cáncer, psoriasis, aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis, (ambas inflamatoria y reumatoide) degeneración macular, enfermedad de Paget, retinopatía, y sus complicaciones vasculares (incluyendo proliferativa y prematura, y retinopatía diabética), proliferaciones vasculares benignas, fibrosis, obesidad e inflamación.

65 Con la palabra “combatir”, incluimos el sentido de que el medicamento puede ser utilizado para aliviar síntomas del trastorno (i.e el método es utilizado de manera paliativa), o para tratar el trastorno, o para impedir el trastorno (i.e el método es utilizado de manera profiláctica).

ES 2 357 609 T3

Por consiguiente, la invención incluye el uso de un anticuerpo que liga de manera selectiva a los residuos 46-209 de MR en la preparación de un medicamento para tratar un paciente que tiene una enfermedad en la cual la angiogénesis contribuye a la patología.

5 Típicamente, la enfermedad es asociada a una indeseable formación de neovasculatura y el tratamiento reduce eso a un alcance útil.

Los medicamentos pueden convenir a humanos o animales. De manera preferible, los medicamentos de la invención son usados para tratar humanos.

10 Con “anticuerpo” se incluye no sólo moléculas enteras de inmunoglobulina sino también fragmentos de ellas tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos de ellas que mantienen el lugar de vinculación del antígeno. De manera similar, la palabra “anticuerpo” se entiende como derivados de anticuerpos por ingeniería genética tal como moléculas Fv de cadena simple (scFv) y anticuerpos de dominio (dAbs). La palabra también incluye moléculas similares a anticuerpos que pueden ser producidas utilizando técnicas de exposición de fagos u otras técnicas de selección aleatoria para moléculas que ligan a MR o a regiones específicas de MR. Por consiguiente, la palabra anticuerpo incluye todas las moléculas que contengan una estructura, de manera preferible una estructura péptida, la cual forma parte del lugar de reconocimiento (i.e la parte del anticuerpo que liga o se combina con el epítipo o antígeno) de un anticuerpo natural.

20 Los dominios variables pesado (VH) y ligero (VL) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento de antígeno, un hecho reconocido por primera vez por tempranas experimentaciones de digestión de proteasa. Una confirmación más tarde fue descubierta con la “humanización” de anticuerpos de roedores. Dominios variables de origen roedor pueden ser fusionados a los dominios constantes de origen humano tal como el anticuerpo resultante mantiene la especificidad antigénica del anticuerpo de origen del roedor (Morrison *et al* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

El que la especificidad antigénica es conferida por dominios variables y es independiente de los dominios constantes se sabe de experimentaciones que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, todos conteniendo uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas Fab-like (Better *et al* (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra *et al* (1988) Science 240, 1038); moléculas Fv de cadena única (ScFv) donde el VH y su asociado de dominio VL están ligados vía un oligopéptido flexible (Bird *et al* (1988) Science 242, 423; Huston *et al* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de dominio único (dAbs) incluyendo dominios V aislados (Ward *et al* (1989) Nature 341, 544). Un informe general de técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que mantienen sus lugares específicos de vínculo se puede encontrar en Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

35 Con el termino “moléculas ScFv” se quiere decir moléculas en donde los dominios asociados VH y VL están ligados vía un oligopéptido flexible. Los anticuerpos manipulados tecnológicamente, tal como los anticuerpos ScFv, pueden ser hechos utilizando las técnicas y enfoques descritas en J. Huston *et al.*, (1988) “Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single Chain Fv analogue produced in *E. coli*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 5879-5883, and in A. Pluckhun, (June 1991) “Antibody engineering; Advances from use of *E. coli*” Bio/technology vol 9.

Las ventajas del uso de fragmentos de anticuerpos, en vez de anticuerpos enteros, son múltiples. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede conducir a la mejora de las propiedades farmacológicas, como mejor penetración al lugar objetivo. Las funciones efectivas de los anticuerpos enteros, tal un enlace complementario, están eliminadas. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv, ScFv y dAb pueden todos ser expresados en y secretados de *E. coli*, por consiguiente permitiendo una producción fácil de una gran cantidad de los fragmentos.

Los anticuerpos enteros, y los fragmentos F(ab')₂ son “bivalentes”. Con “bivalente” nos referimos a que los anticuerpos y fragmentos F(ab')₂ tienen dos lugares de combinación de antígenos. En contraste, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, teniendo sólo un lugar de combinación de antígeno.

Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, es preferible si es un anticuerpo monoclonal. En algunas circunstancias, especialmente si el anticuerpo va a ser administrado de manera repetida a un paciente humano, es preferible que el anticuerpo monoclonal sea un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado.

Anticuerpos monoclonales que convienen y que son reactivos como aquí se ha descrito pueden ser preparados por técnicas conocidas, por ejemplo los que están revelados en “Monoclonal Antibodies: A manual of techniques”, H. Zola (CRC Press, 1988) y en “Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application”, SGR Hurell (CRC Press, 1982). Pueden producirse anticuerpos policlonales los cuales son poli específicos o mono específicos. Se prefiere cuando son mono específicos.

Anticuerpos quiméricos están discutidos por Neuberger *et al* (1998, International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

65 Es preferible cuando el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Anticuerpos no humanos preparados adecuadamente pueden ser “humanizados” como se sabe, por ejemplo insertando las regiones CDR de anticuerpos de ratón dentro de la estructura de anticuerpos de humanos. Anticuerpos humanizados, pueden ser fabricados mediante las

ES 2 357 609 T3

técnicas y enfoques descritos en M. Verhoeyen, C. Milstein and G. Winter (1988) "Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity", *Science*, 239, 1534-1536, and in C. Kettleborough *et al.*, (1991) "Humanisation of a mouse monoclonal antibody by CDR grafting; The importance of framework residues in loop conformation", *Protein Engineering*, 14(7), 773-78.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos en el sentido que tienen la secuencia de aminoácidos de anticuerpos humanos anti-MR pero pueden ser preparados utilizando métodos muy bien conocidos que no necesitan inmunización de humanos. Por ejemplo, están disponibles ratones transgénicos que contienen, en lo esencial, genes de inmunoglobulina humanos (ver Vaughan y al (1998) *Nature Biotechnol.* 16, 535-539).

Un segundo aspecto de la invención facilita un método *in vitro* de inhibición de angiogénesis que consiste en administrar un anticuerpo que liga selectivamente a los residuos 46-209 de MR humano o tejido o células *in vitro*. Las células pueden ser líneas de células establecidas, o células que han sido extraídas de un individuo. Los tejidos o células son de manera preferible tejido o células de mamíferos, y de manera más preferible son células o tejidos humanos.

En los dos primeros aspectos de la invención, el anticuerpo liga selectivamente a la región Ig de MR la cual es ubicada en los residuos 46-209 de MR (Figura 3, SEQ ID NO: 4).

En una realización preferida, el anticuerpo liga selectivamente al dominio IgA de MR, que está situado en los residuos 46-116 de MR (Figura 4A, SEA ID NO: 5).

En otra realización alternativa, el anticuerpo liga selectivamente al dominio IgB de MR, que está situado en los residuos 151-209 de MR (Figura 4B, SEQ ID NO: 6).

En una realización de cada uno de los primeros dos aspectos de la invención, el anticuerpo tiene al menos una región con cadena ligera variable incorporando los siguientes CDRs

CDR1: S A S S S V S Y M Y (SEQ ID NO: 9);
CDR2: L T S N L A S (SEQ ID NO: 10); y
CDR3: Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11).

En una realización mas específica, el anticuerpo puede tener al menos una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia aminoácida:

Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M Y W
Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S
Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E
L K (SEQ ID NO: 12).

De manera preferible, la cadena ligera es una cadena ligera kappa.

En una realización de cada uno de los dos primeros aspectos de la invención, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena pesada incorporando los CDRs siguientes:

CDR1: D Y N L N (SEQ ID NO: 13);
CDR2: V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14); and
CDR3: G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15).

En una realización más específica, el anticuerpo puede tener al menos una región variable de cadena pesada incluyendo la secuencia de aminoácido siguiente:

Q V K / Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S L T D Y N L
N W V K Q N K G K S L E W I G V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G K A
T L T V D Q S S S T T Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R G R D Y
F G Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NOs: 16 and 17),

ES 2 357 609 T3

Donde K/Q significa que cualquiera de los dos K o Q está presente en esta posición (K está presente en SEQ ID NO: 16, mientras Q está presente en SEQ ID NO: 17).

5 En una realización aún más específica, el anticuerpo tiene al menos una región de cadena ligera variable como antes descrita y al menos una región con una cadena pesada variable como antes descrita.

Un tercer aspecto de la invención facilita el uso de un polinucleótido codificando un anticuerpo como antes descrito en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

10 Un cuarto aspecto de la invención facilita un método *in vitro* para inhibir angiogénesis incluyendo la administración de un polinucleótido codificando un anticuerpo como antes descrito para tejido o células *in vitro*.

15 Un quinto aspecto de la invención facilita un anticuerpo que liga a los residuos 40-209 de un MR humano y que contiene las secuencias aminoácidas i) a iii), las secuencias de aminoácido Iv9 a vi9, o de manera preferible las secuencias de aminoácido i) a vi):

i) S A S S S V S Y M Y (SEQ ID NO: 9)

20 ii) L T S N L A S* (SEQ ID NO: 10)

iii) Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11)

iv) D Y N L N (SEQ ID NO: 13)

v) V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14)

25 vi) G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15).

25

Mientras, los CDRs que determinan la especificidad de ligar al antígeno pueden ser determinados de manera empírica, ha sido demostrado que en un número significativo de casos ellgHCDR3 es la región más importante de CDR. Por consiguiente, la invención incluye un anticuerpo con una región CDR3 de Ig de cadena pesada teniendo la secuencia aminoácida GRDYFGY (SEQ ID NO: 15).

30

De manera preferible, el anticuerpo inhibe un función de MR. Tales funciones incluyen a inhibición de unión de ligandos, la interacción con otras moléculas de superficie celular y la inhibición de la activación del receptor.

35 De manera preferible, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera incorporando los CDRs siguientes:

CDR1: S A S S S V S Y M Y (SEQ ID NO: 9)

40 CDR2: L T S N L A S (SEQ ID NO: 10)

CDR3: Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11)

40

45 De manera más preferible, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera incluyendo la secuencia aminoácida siguiente:

Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M Y W

50 Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S

Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E

55 L K (SEQ ID NO: 12).

55

De manera preferible, la cadena ligera es una cadena ligera kappa.

60 De manera preferible, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena pesada incluyendo los siguientes CDRs:

CDR1: D Y N L N (SEQ ID NO: 13)

65 CDR2: V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14)

CDR3: G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15)

65

ES 2 357 609 T3

De manera más preferible, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena pesada incluyendo la secuencia de aminoácido:

5 QV K/Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S L T D Y N L
N W V K Q N K G K S L E W I G V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G K A
T L T V D Q S S S T T Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R G R D Y
10 F G Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NOs: 16 and 17).

De manera aún más preferible, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera como antes definida en el quinto aspecto de la invención y al menos una región de cadena pesada como definida antes en el quinto aspecto de la invención.

De manera más preferible, el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera incluyendo la secuencia aminoácida:

20 Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M Y W
Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S
25 Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E
L K (SEQ ID NO: 12)

30 Y al menos una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácido:

35 Q V K / Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S L T D Y N L
N W V K Q N K G K S L E W I G V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G K A
T L T V D Q S S S T T Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R G R D Y
40 F G Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NOs: 16 and 17).

Es preferible si el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

45 Es adicionalmente preferible si el anticuerpo es un anticuerpo humanizado teniendo los CDRs siguientes:

50 CDR1 cadena ligera: S A S S S V S Y M Y (SEQ ID NO: 9);
CDR2 cadena ligera: L T S N L A S (SEQ ID NO: 10);
CDR3 cadena ligera: Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11);
CDR1 cadena pesada: D Y N L N (SEQ ID NO: 13);
CDR2 cadena pesada: V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14); and
CDR3 cadena pesada: G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15).

55 Un sexto aspecto de la invención facilita un anticuerpo que selectivamente liga al epítipo MR ligante ligado selectivamente por un anticuerpo teniendo al menos una región variable de cadena ligera incluyendo la secuencia de aminoácido siguiente:

60 Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M Y W
Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S
65 Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E
L K (SEQ ID NO: 12)

ES 2 357 609 T3

Y al menos una región variable de cadena pesada incluyendo la secuencia de aminoácido:

5 **QVK/QLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSLTDYNL**
 NWVKQNKGKSLEWIGVINPNYGTTSYNQKFKGKA
 TLTVDQSSSTTYMQLNSLTSEDSAVYYCARGRDY
10 **FGYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NOs: 16 and 17).**

15 Por un anticuerpo que liga selectivamente al epítipo de MR por otro anticuerpo definido, incluimos un anticuerpo que compite con el anticuerpo definido. Tales anticuerpos pueden ser determinados, por ejemplo, utilizando ensayos ligantes competitivos, de manera preferible pruebas ligantes con alto rendimiento, como son conocidos por una persona experta en la técnica. Ensayos adecuados incluyen una competición cruzada ELISA en la cual un fragmento extracelular de MR es incubado con el anticuerpo definido y un anticuerpo test, para determinar si el anticuerpo test compite no con el anticuerpo definido para ligarse con el epítipo MR.

20 Un séptimo aspecto de la invención facilita un polinucleótido que codifica un anticuerpo como se ha definido en el quinto o sexto aspecto de la invención.

 En una realización, el polinucleótido incluye al menos una de las secuencias de nucleótidos.

25 i) AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC (SEQ ID NO: 18);
 ii) TCT CAC ATC CAA CCT GGC TTC T (SEQ ID NO: 19); and
 iii) CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA CTC ACG (SEQ ID NO: 20).

30 De manera preferible, el polinucleótido incluye dos o todas las tres de las secuencias de nucleótidos i) ii) y iii).

 De manera, el polinucleótido incluye la secuencia de nucleótidos:

35 **CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA CTC ATG TCT GCA TCT**
 CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA
 AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA AGA
40 **TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT CTC ACA TCC AAC CTG GCT**
 TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG
 ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA
45 **GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC**
 CCA CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA
 (SEQ ID NO: 21).

50 En una realización alternativa o adicional, el polinucleótido incluye al menos una de las secuencias de nucleótidos:

55 iv) GAC TAC AAC CTG AAC (SEQ ID NO: 22)
 v) GTA ATT AAT CCA AAC TAT GGT ACT AGT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GGC (SEQ ID NO:
 23), and
 vi) GGG AGG GAT TAC TTC GGC TAC (SEQ ID NO: 24)

60 De manera preferible, el polinucleótido incluye dos o todas las tres de las secuencias iv), v) y vi).

65

ES 2 357 609 T3

De manera preferible, el polinucleótido incluye la secuencia nucleótida:

5 CAG GTC AAG(or A/CAA) CTG CAG GAG TCA GGA CCT GAG CTG
GTG AAG CCT GGC GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT
TCT GGT TAC TCA CTC ACT GAC TAC AAC CTG AAC TGG GTG
10 AAG CAG AAC AAA GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA GTA
ATT AAT CCA AAC TAT GGT ACT AGT TAC AAT CAG AAG TTC
AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC CAA TCT TCC AGC
15 ACA ACC TAC ATG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAC

TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA GGG AGG GAT TAC TTC
20 GGC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA.

(El polinucleótido teniendo AAA en el tercer codón es SEQ ID NO: 26; y el polinucleótido teniendo CAA en el tercer codón es SEQ ID NO: 27).

De manera más preferible, el polinucleótido incluye al menos una secuencia nucleótida:

25 CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA CTC ATG TCT GCA TCT
CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA
30 AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA AGA
TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT CTC ACA TCC AAC CTG GCT
35 TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG
ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC
40 CCA CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA
(SEQ ID NO: 21),

45 Y al menos una secuencia nucleótida:

50 CAG GTC AAG(or A/CAA) CTG CAG GAG TCA GGA CCT GAG CTG
GTG AAG CCT GGC GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT
TCT GGT TAC TCA CTC ACT GAC TAC AAC CTG AAC TGG GTG
AAG CAG AAC AAA GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA GTA
55 ATT AAT CCA AAC TAT GGT ACT AGT TAC AAT CAG AAG TTC
AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC CAA TCT TCC AGC
ACA ACC TAC ATG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAC
60 TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA GGG AGG GAT TAC TTC
GGC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
65 (SEQ ID NOs: 25-27).

ES 2 357 609 T3

En una realización las dos regiones codificantes pueden estar en el mismo polinucleótido, por ejemplo en un polinucleótido de expresión para un anticuerpo ScFv.

5 Un octavo aspecto de la invención facilita a un anticuerpo que liga selectivamente ligante a la región Ig de MR (residuos 46-209, SEQ ID NO: 4) pero que no liga selectivamente al péptido LLQPPARGHAHDGQALSTDL (residuos 91-109, de MR, SEQ ID NO: 28) o al péptido LSQSPGAVPQALVAWRA (residuos 165-181 de MR, SEQ ID NO: 29).

10 En una realización, la invención incluye un anticuerpo que liga selectivamente a la región IgA de MR (residuos 46-116, SEQ ID NO: 5) pero no se liga selectivamente al péptido LLQPPARGHAHDGQALSTDL (residuos 91-109 de MR, SEQ ID NO: 28).

15 En una realización alternativa, la invención incluye un anticuerpo que se liga selectivamente a la región IgB de MR (residuos 165-181 de MR, SEQ ID NO: 29) pero no se liga selectivamente al péptido LSQSPGAVPQALVAWRA (residuos 165-181 de MR, SEQ ID NO: 29).

Un noveno aspecto de la invención facilita a un polinucleótido que codifica un anticuerpo como definido en el octavo aspecto de la invención.

20 Un décimo aspecto de la invención facilita un componente incluyendo un anticuerpo como definido encima en el quinto, sexto, y octavo aspecto de la invención, y una fracción citotóxica.

La fracción citotóxica es de manera preferible directamente o indirectamente tóxica para las células en neovascularizado o para las células muy cercanas a y asociadas a la neovascularizado.

25 Con “directamente citotóxica” se incluye el sentido que la fracción es en sí misma citotóxica. Con “indirectamente citotóxica” se incluye el sentido que la fracción es una que, aunque no sea ella misma tóxica, puede provocar citotoxicidad, por ejemplo, por su acción sobre una molécula adicional o una acción adicional sobre ella.

30 En una realización, la fracción de citotóxica es un agente citotóxicos quimioterapéutico. Agentes citotóxicos quimioterapéuticos son muy conocidos en la técnica.

35 Agentes citotóxicos quimioterapéuticos, como agentes anti-cáncer, incluye, agentes alquilantes agentes incluyendo mostaza de nitrógeno como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan (L-sarcolisina) y clorambucil; etileniminas y metilmelaminas como hexametilmelamina, tiotepa; alquil sulfonatos como busulfano; nitrosoureas como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); y triazenos como decarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida); Antimetabolitos incluyendo análogos de ácido fólico como metotrexato (amopterin); análogos de pirimidine como fluorouracil (5-fluorouracil; 5-FU), floxuridine (fluorodeoxiuridine; FUdR) y citarabine (citosina arabinosida); y análogos de purina e inhibidores relacionados como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-thioguanina; TG) y pentostatina (2'-deoxicoformycina). Productos naturales que concluyen alcaloides de vinca como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodopillotoxinas como etoposida y teniposida; antibióticos como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); enzimas como L-asparaginasa; y modificadores de respuesta biológica como interferon alfa. Agentes Misceláneos que incluyen complejos de coordinación de platino como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracenediona como mitoxantrona y antraciclina; urea sustituida como hidroxurea; derivado de metil hidracine como procarbazona (N-metilhidracine, MIH); y supresor adrenocortical como mitotan (o, p'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos/derivados; y agonistas/antagonistas de hormona como flutamida y tamoxifen.

50 Numerosos de estos agentes han sido previamente unidos a anticuerpos y otros agentes de suministro en lugares objetivo, y así componentes de la invención incluyendo estos agentes puede fácilmente ser hechos por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, puede usarse conjugación de carbodiimida (Bauminger & Wilchek (1980) Methods Enzimol. 70, 151-159; incorporado aquí por referencia.) para conjugar una variedad de agentes, incluyendo doxorubicina, a anticuerpos.

55 Carbodiimides incluye un grupo de componentes que tienen una fórmula general $R-N=C=N-R'$, donde R y R' pueden ser alifático o aromático, y están utilizados para síntesis de lazos péptidos. La preparación preliminar es simple, relativamente rápida y es llevada bajo condiciones moderadas. Componentes carbodiimide ataca grupos carboxílica para cambiarlos en reactivos lugares para grupos de aminos libres.

60 El agua soluble carbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) es particularmente muy útil para conjugar una fracción funcional a un anticuerpo y puede ser utilizado para conjugar doxorubicin a una tumor alojando péptidos. La conjugación del doxorubicin y de un anticuerpo necesita la presencia de un grupo amino, lo cual es facilitado por doxorubicin, y un grupo carboxyl, lo cual es facilitado por el anticuerpo tal como un anticuerpo o péptido.

65 Además de utilizar carbodiimides para la formación directa de lazos de péptidos, EDC también puede ser utilizado para preparar ésteres activos tal como N-hydroxysuccinimide (NHS) éster. El éster NHS, que liga solo a grupos de

ES 2 357 609 T3

aminos, luego puede ser utilizado para producir la formación de un lazo de un amido con el único grupo de amino del doxorubicin. El uso de EDC y NHS combinados se suele usar para conjugar con el objetivo de incrementar rendimiento de formación conjugado (Bauminger y Wilchek, *supra*, 1980).

5 Otros métodos para conjugar una fracción de citotóxica a un anticuerpo también puede ser utilizado. Por ejemplo, la oxidación periódica del sodium, seguida por la reducción de alkytion de reactivos apropiados pueden ser utilizados, tal como lo puede el glutaraldehyde reticulación. Sin embargo, es reconocido que, sin mirar cual tipo de producción de un componente de la invención es elegido, se debe hacer una determinación de que el anticuerpo mantiene su habilidad de objetivo y que la fracción apegada mantiene su función relevante.

10 En una realización más de la invención, la fracción de citotóxica es un péptido citotóxica o una fracción polipéptida por la cual incluimos cualquier fracción que conduce a la muerte de la célula.

15 El péptido citotóxica o las fracciones de polipéptidos son muy conocidos en el dominio, e incluye, por ejemplo, ricin, abrin, *Pseudomonas* exotoxin, factor de tejido o igual. Métodos para ligarlos para alcanzar fracciones tal como anticuerpos son muy conocidos en el dominio también. El uso de ricin como un agente citotóxico se describe en Burrows y Thorpe (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8996-9000, y el uso de un factor de tejido, lo cual conduce a localizar coagulación de sangre e infarto de una tumor, ha sido descrito por Ran *et al.* (1998) Cancer Res. 58. 4646-4653 y Huang *et al.* (1997) Science 275, 547-550. Tsal *et al* (1995) Dis Colon Rectum 38. 1067-1074 describe la cadena abrin A conjugado a un anticuerpo monoclonal. Otra ribosoma inactivando proteínas se describen como agentes citotóxicos en WO 96/06641. Los pseudomonas exotoxin pueden también ser utilizados como la fracción de polipepto citotóxica (ver, por ejemplo, Aiello *et al* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92. 10457-10461.

25 Ciertas cito fines, tal como TNF α y IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos.

30 Ciertos átomos radioactivos también pueden ser citotóxicos si están entregados en dosis suficientes. Por consiguiente, la fracción citotóxica puede incluir un átomo radioactivo lo cual, en el uso, entrega una cantidad suficiente de radioactividad al lugar de objetivo, en el propósito de ser citotóxico. Átomos radioactivos que conviene incluyen fosforus-32, iodine-125, iodine-131, indium-111, rhenium-186, rhenium-188 o yttrium-90, o cualquier otro isotopo que emita bastante energía para destruir las células alrededores, órganos o ácido nucleico. De manera preferible, los isotopos y la densidad de átomos radioactivos en la composición de la invención son tales como una dosis de más de 4000 cGy (de manera preferible al menos 6000, 8000 o 10000 cGy) es entregado al sitio del objetivo y, de manera preferible, a las células en este lugar de objetivo y sus órganos, particularmente los núcleos.

35 El átomo radioactivo puede ser apegado al anticuerpo de las formas conocidas. Por ejemplo EDTA o otro agente quelante puede ser apegado al anticuerpo y utilizado para sujetar 111 In o 90 Y. Los residuos de tirosina pueden ser eticados con 125 o 131.

40 La fracción de citotóxica puede ser un polipéptido citotóxico que conviene indirectamente. En una particular realización preferida, el polipéptido citotóxico indirecto es un polipéptido que tiene una actividad enzimática y que puede convertir un pro fármaco relativamente no tóxico en una droga citotóxico. Cuando la fracción de selección del objetivo es un anticuerpo este tipo de sistema se refiere a menudo como ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy).

45 El sistema requiere que la fracción del objetivo ubique la porción al lugar deseado en el cuerpo del paciente (ejemplo: el lugar de expresión es MR, tal y como nuevos tejidos vasculares asociados a un tumor) y después de haber dejando tiempo a la enzima para que ubique en el sitio, administrando un pro fármaco que es una base para el enzima, el producto final del catálisis volviéndose un componente citotóxico. El objetivo del estudio es de maximizar la concentración de droga en el sitio deseado y de mermar la concentración de droga en los tejidos normales (ver Senter. P.D *et al* (1988) "Efectos antihumores de fosfatase dealkalina anticuerpo conjuga con una combinación con fosfotaso de etoposido" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531-2; and Bagshawe, K.D. *et al* (1988) "Un agente citotóxica puede ser selectivamente generado a sitios de cáncer" por Br. J. Cancer. 58, 700-703.)

55 La substancia citotóxica puede ser cualquier anti -cáncer droga existente tal como un agente alkylat; un agente que intercala en DNA; un agente que inhibe cualquier enzima llave tal como reducto dihydrofolatereductasa, timidilatosintetasa, ribonucleotidoreductasa, nucleosido kinasos o topoisemerase; o un agente cuyo efecto es la muerte de la célula por actuar recíprocamente. Etoposide es un ejemplo de un inhibidor topoisomerase.

60 El sistema pro fármaco relatado incluye: un pro fármaco mostaza de fenol activado por un *E. coli* b-glucuronidasa (Wang *et Al-*, 1992 y Roffler *et Al-*, 1991); un pro-fármaco doxorubicin activado por un b-glucuronidasa humano (Bosslet *et Al-*, 1994); más pro fármaco doxorubicin activado por grano de café a-galactosidasa (Azoulay *et Al-*, 1995); pro fármaco daunorubicin, activado por grano de café a- D-galactosidasa (Gesson *et Al-*, 1994); un 5-pro fármaco fluorouridina activado por un *E. coli* b- D-galactosidasa (Abraham *et Al-*, 1994); y pro fármaco metotrexato (ej metotrexato-alanine) activado por carboxypeptidase A (Kuefner *et Al-*, 1990, Vitols *et Al-*, 1992 y Vitols *et Al-*, 1995). Estos y otros son incluidos en el cuadro 1.

ES 2 357 609 T3

TABLA 1

Enzima	Promedicamento
Carboxipeptidasa G2	Derivados de ácido L-glutámico y mostazas de ácido benzoico, mostazas de anilina, mostazas de fenol y mostazas de feilenediamina, derivados fluorinados de estos.
Alcalina fosfatasa	Etoposido fosfato
Beta-glucoronidasa	Mitomicina fosfato
Penicilina V- amidasa	p-mostaza hidroxianilina-glucoronida
Penicilina G- amidasa	Epirubicin-glucoronida
Beta- lactamasa	Adriamicina-N fenolxiacetil
Beta-glucosidasa	N-(4'-hidroxifenil acetil) palitoxin
Nitroreductasa	Doxorubicin y melfalan
Citosina deaminasa	Mostaza nitrógeno- cefalosporin p-fenilenediamina; derivados de doxorubicina, derivado vinblastina-cefalosporin, mostaza cefalosporin; un derivado de taxol
Carboxipeptidasa	Cianofenilmetil-beta-D-gluco-ácido piranosidurónico
	5-(azarin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamida
	5-Fluorocitosina
	Metotretaxato-alanina

(Esta tabla es adaptada de Bagshawe (1995) la Medicina (Droga) Dev. R. 34, 220-230, de lo cual referencias llenas de estos varios sistemas pueden ser obtenidos; el derivado taxol es descrito en Rodrigues, M.L. *et Al-* (1995) la Química y la Biología 2, 223).

Enzimas convenientes para formar parte de la parte enzimática de la invención incluyen: exopeptidasas, como carboxypeptidasas G, G1 y G2 (para pro fármaco mostaza glutamilatado), carboxypeptidasas A y B (para pro-fármaco MTX-basado) y aminopeptidasas (para pro-fármaco 2- a-aminocyl MTC); endopeptidasas, como eg trombolysin (para pro fármaco trombin); hydrolasas, como fosfatasas (ej fosfatasa alcalino) o sulfatasas (ej aryl sulfatasas) (para fosfílato O pro-fármaco sulfato); amidasas, como penicilina amidasas y arylacyl amidasa; lactamasas, como b-lactamasas; glycosidasas, como b-glucuronidasa (para b-glucuronomide antracyclines), a-galactosidasa (para amygdalin) Y y b-galactosidasa (para y b-galactosa antracyclino); deaminasas, como citosina deaminasa (para 5FC); quinasas, como uroquinase y timidina quinasa (para gancyclovir); reductasas, como nitroreductasa (para CB1954 y análogos), azoreductasa (para mostazas azobenzeno) y DT-diaforasa (para CB1954); oxidases, como glucosa oxidasa (para glucosa), xantina oxidase (para xantina) y lactoperoxidasa; DL-racemases, anticuerpos catalíticos y cyclodextrinos.

Este pro fármaco es relativamente no - tóxico comparado a la medicina (droga) citotóxica. Típicamente esto tiene menos del 10% de la toxicidad, preferentemente menos del 1% de la toxicidad como medurado en una prueba de cytotoxicity *in vitro* conveniente.

Es probable que la fracción que es capaz de convertir un pro fármaco en una medicina (droga) citotóxica será activa en el aislamiento del resto del componente pero es necesario sólo para ello ser activo cuando (a) ello está en la combinación con el resto del componente y (b) el compuesto es conectado a, adyacente a o interiorizado en células objetivas.

Cuando cada fracción del compuesto es un polipéptido, las dos partes pueden ser unidas juntos por cualquier camino convencionales de cruz de unión de polipéptidos, como aquellos generalmente descritos en O'Sullivan *et Al-* (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108. Por ejemplo, el anticuerpo anti-MR de puede ser enriquecido por grupos de tiol y la remota mitad reaccionado con un agente bifuncional capaz de reaccionar con aquellos grupos de tiol, por ejemplo la N-hydroxysuccinimida éster de ácido iodoacetico (NHIA) o N-succinimidy1-3-(2-pyridyldithio) propionato (SPDP). Amida y capa de adhesivo de tioeter, por ejemplo alcanzado con m-maleimidobenzoyl-N-ester hydroxysuccinimide, son generalmente más estables *in vivo* que lo son capas de adhesivos disulfida.

De manera alternativa, el componente puede ser producido como un componente de fusión por técnicas de ADN recombinantes por el cual una longitud de ADN comprende regiones respectivas que codifican las dos mitades del componente de la invención o adyacente el uno al otro o separado por una región que codifica un péptido de enlazador que no destruye las propiedades deseadas de el componente. Evidentemente, las dos partes del componente pueden superponerse totalmente o en parte.

El ADN es entonces expresado en un anfitrión conveniente para producir un polipéptido que comprende el componente de la invención.

ES 2 357 609 T3

La fracción citotóxica puede ser un radiosensitizador. Radiosensitizadores incluyen fluoropyrimidines, timidine análogos, hydroxyurea, gemcitabina, fludarabina, nicotinamida, pyrimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamida, etanixadola, pimonidazola y misonidazola (ver, por ejemplo, McGinn *et Al* (1996) la J. Natl. Cancer Inst. 88, 1193-11203; Shewach y Lorenzo (1996) Invest. Nw drugs 14, 257-263; Horsman (1995) Acta Oncol. 34, 571-587; Shenoy y Singh (1992) Clin. Clin invest. 10, 533-551; Mitchell *et Al*-(1989) Int. J. Radiat. Biol. 56, 827-836; Iliakis y Kurtzman (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Fys. 16, 1235-1241; Brown (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Fys. 16, 987-993; Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

5 También, la entrega de genes en células puede radiosensitizar éstas, por ejemplo la entrega del gen p53 o la D cyclin (Lang *et Al*- (1998) J. Neurosurg. 89, 125-132; Coco Martin *et Al*- (1999) R de Cancer. 59, 1134-1140).

La remota mitad puede ser una que se hace citotóxico, o libera una mitad citotóxica, sobre la irradiación. Por ejemplo, el boro-10 isótopo, cuando es de manera apropiada irradiado, libera las partículas que son citotóxicas (ver por ejemplo, EE.UU 4,348,376 a Goldenberg; Primus *et Al*- (1996) Bioconjug. Chem. 7, 532-535). Asimismo, la mitad citotóxica puede ser la que es útil en la terapia fotodinámica como fotofrin (ver, por ejemplo, Dougherty *et Al*- (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

La mitad citotóxica puede ser una molécula ácida nucleica que es directamente o indirectamente citotóxica. Por ejemplo, la molécula ácida nucleica puede ser un antisentido oligonucleótido que, sobre la localización en el sitio objetivo es capaz de de que entre en células y plomo (ventaja) a su muerte. El oligonucleótido, por lo tanto, puede ser el que previene la expresión de un gen esencial, o uno que conduce a un cambio de la expresión génica que causa apoptosis.

Los Ejemplos de oligonucleótidos conveniente incluyen aquellos dirigidos en bcl-2 (Ziegler *et Al*- (1997) la J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036), y polimerasis de ADN un y topoisomerase II a (Lee *et al* (1996) Anticancer Res. 16, 1805-1811).

Los ácidos pépticos nucleidos pueden ser útil en el lugar de ácidos convencionales nucleidos (see a Knudsen y Nielsen (1997) El Anticancer Droga 8, 113-118).

30 Un undécimo aspecto de la invención proporciona un polinucleótido que codifica un componente como definido encima en el décimo aspecto de la invención, en el que el anticuerpo y la mitad citotóxica son los polipéptidos que son fundidos.

35 Un duodécimo aspecto de la invención proporciona un componente que comprende un anticuerpo como definido encima en el quinto, los sextos y octavos aspectos de la invención, y una mitad fácilmente perceptible.

Un compuesto que comprende un anticuerpo anti-MR como se define arriba y una mitad fácilmente perceptible puede ser usado, en combinación de un método de detección apropiado, para descubrir la ubicación del componente en el individuo, y de ahí identificar los sitios y extensión de angiogénesis en el individuo, así como inhibición del angiogénesis en el individuo.

45 Con “una mitad fácilmente perceptible” nos referimos a que la mitad es la que, cuando localizado en el sitio objetivo después de la administración del componente de la invención en un paciente, puede ser descubierta, típicamente no invasivamente de afuera del cuerpo y el sitio del objetivo localizado. Así, los componentes de esta realización de la invención son útiles en representar y en los diagnosis.

Típicamente la mitad fácilmente perceptible es o comprende un átomo radiactivo que es útil en la imagimática. Átomos radiactivos convenientes incluyen el tecnecio-99m o el yodo-123 para estudios de scintigrafic. Otras mitades fácilmente perceptibles incluyen, por ejemplo, etiquetas de espín para la imagimática de resonancia magnética (MRI) como el yodo-123 otra vez, el yodo-131, el indio-111, flúor-19, carbón-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, el componente de la invención debe tener suficiente de los isótopos apropiados atómicos para que la molécula sea fácilmente perceptible.

55 El radio - u otras clasificaciones pueden ser incorporadas al compuesto de la invención de modos Por ejemplo, si el anticuerpo es un polipéptido esto puede ser biosintetizado o puede ser sintetizado la síntesis de aminoácido química, utilizando precursores de aminoácido convenientes, implicando, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Clasificaciones tal como 99mTc, 123I, 186Rh, 188Rh y 111In, por ejemplo, pueden ser conectadas vía residuos de cisteína en el anticuerpo. Ytrio-90 puede ser conectado vía un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et Al*- (1978) Biochem. Biofys. R. Comm. 80, 49-57) puede ser usado para incorporar el yodo-123. Referencia (“Monoclonal Anticuerpos en Immunoscintigrafy”, J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros métodos con detalles.

65 Un decimotercer aspecto de la invención proporciona un vector incluyendo un polinucleótido como definido encima en los aspectos séptimos, noveno y undécimo de la invención.

ES 2 357 609 T3

Los vectores plásmidos procarióticos típicos son: PUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponible de los Laboratorios Biorad (Richmond, CA, EE.UU.); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 y pRIT5 disponible de Farmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.); pBS vectores, Fagescript vector, Bluescript vectores, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A disponible de Stratagen Cloning systems (La Jolla, CA 92037, EE.UU.).

Un vector plásmido de célula mamiferita típica es pSVL, disponible de Farmacia (Piscataway, NJ, EEUU). Este vector utiliza el último promotor SV40 para conducir expresión de genes clonados, el nivel más alto de expresión descubierto en T antígeno produciendo células, tal como células COS-1. Un ejemplo de un inducible vector de expresión mamiferita es pMSG, también disponible de Farmacia (Piscataway, NJ, EEUU). Este vector utiliza el promotor inducible glucocorticoido del ratón virus de tumor mamario repetición larga terminal para conducir expresión del gen reproducido.

Vectores plásmidos de levadura útiles son Prs403-406 y pRS413-416 y suelen ser disponibles de sistemas de clonaje stratagen (La Jolla, CA, 92037, USA). Los vectores plásmidos son prS403-406 y están disponibles de Stratagen pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 que son levaduras plásmidas integrantes (YIps) e incluye marcadores de levadura selectiva HIS3, TRP1, LEU2, y URA3. Plásmidos Prs413-416 son plásmidos de centromeros de levadura (YCps). Plásmidos pRS413-416.

Métodos muy conocidos de los calificados pueden ser utilizados para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codeada y, por ejemplo controles apropiados transcriptionalizados o translationalizados. Un método de tal incluye ligation vía colas de homopolímero. Se añade a Colas de PolidA homopolímero (o polydC) grupos de 3'-OH del fragmento del DNA para clonarlo por transferasas terminal deoxynucleotidil. El fragmento es, luego, capaz de recogerse a las colas polydT (o polydG) añadidos al fin de un fin vector de plasmado linearizado. Ausencias, dejados luego al recocido pueden ser rellenadas por polimerase DNA y los fines libres.

Otro método incluye ligadura extremos cohesivos. Extremos romos cohesivos pueden ser regenerados en el fragmento y vector de DNA por el acción de reducción de enzimas que convienen. Estos romos flamearan rápidamente a través de muellas de apareamientos de base et restantes complementarios y pueden ser cerrados por la acción de de ligase de DNA.

Otro método utiliza moléculas sintéticas llamadas lazos y adaptores. Los fragmentos de DNA con extremos romos son generados por bacteriófago T4 DNA polimerasa o *E. coli* DNA polimerasa el cual quita 3' terminal protuberante y rellena los 3' romos acoplados. Lazos sintéticos, partes de romos-extremos dobles-DNA trenzado que contiene secuencias de reconocimiento para enzimas restricionadas definidas, que pueden ser ligados al romo-fragmentos de extremos de DNA por ligase T4 DNA I. Son digeridas posteriormente con una restricción de enzimas para crear extremos cohesivos y ligados a un vector de expresión compatible con un terminal. Adaptos son también fragmentos químicamente de DNA sintetizados que contienen un ramo extremo utilizado para ligación pero que tiene también un extremo cohesivo preformado.

Ligantes sintéticos que contienen una variedad de lugar de restricción de endonucleasa están disponibles comercialmente desde numerosos fuentes incluyendo International Biotechnologies Inc., New Haven, CN, USA.

Una manera deseable de modificar el ADN codificando el polipéptido de la invención es de utilizar la reacción de cadena de polimerasa como revelado por Saiki *et al* (1988) Science 239, 487-491. En este método el ADN por ser ampliado de enzimas es sacado con dos primeros oligonucleótidos específicos que se vuelven incorporados al ADN amplificado por sí mismo. Los primeros específicos pueden contener lugares de reconocimiento de endonucleasa restringidos lo cual puede ser utilizado para clonar en vectores utilizando métodos ya bien conocidos.

Un decimocuarto aspecto de la invención facilita una célula portadora que comprende un polinucleótido como se definió en el séptimo, noveno, y undécimo aspecto de la invención, o un vector como definido en el decimotercero aspecto de la invención.

Muchos sistemas de expresiones son conocidos, incluyendo sistemas empleando: bacteria (eg. *E. coli* y *Bacillus subtilis*) transformados con, por ejemplo, bacteriofagos recombinantes, vectores de expresión de ADN plásmido o cosmido; Levaduras (eg. *Saccharomyces cerevisiae*) transformado con, por ejemplo, vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos transformados con, por ejemplo, vectores de expresión viral (eg. baculovirus); sistemas de células de plantas trasladados con, por ejemplo viral, o vectores de expresión bacterial; sistemas celulares de animales trasladado con, por ejemplo, vectores de expresión de adenovirus.

Los vectores pueden incluir un procariota replicada, tal como el Col E1 ori, para la propagación en un procariota, aun si el vector se suele utilizar para expresión en otro, célula de tipo no-procariótica. El vector también puede incluir un promotor apropiado tal como el promotor procariótico capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los genes en una célula portadora bacterial, tal como *E. coli*, transformado con eso.

Un promotor es un elemento de control de expresión formado por una secuencia de ADN que permite ligar la polimerasa RNA que ocurre en la transcripción. Secuencias de promotores compatibles con bacterias portadoras ejempladas son típicamente facilitadas en vectores de plásmido que contienen lugares de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.

ES 2 357 609 T3

El polinucleótido en una célula portadora que conveniente puede ser extraído para producir el anticuerpo o componente de la invención. Por consiguiente, el polinucleótido puede ser utilizado conforme a las técnicas conocidas, modificada de manera apropiada en vista de la enseñanza contenida en este, para construir un vector de expresión, lo cual es luego utilizado para transformar una célula portadora apropiada para la expresión y la producción de un anticuerpo o componente de la invención. Tales técnicas incluyen las reveladas en US Patent Nos. 4,440,859 sacado el 3 de abril de 1984 a Rutter *et al*, 4,530,901 sacado el 23 de julio de 1985 a Weissman, 4,582,800 sacado el 15 de abril de 1986 a Crowl, 4,677,063 sacado el 30 de junio de 1987 a Mark *et al*, 4,678,751 sacado el 7 de julio de 1987 a Goeddel, 4,704,362 sacado el 3 de noviembre de 1987 a Itakura *et al*, 4,710,463 sacado el 1ero de diciembre de 1987 a Murray, 4,757,006 sacado el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. *et al*, 4,766,075 sacado el 23 de agosto de 1988 a Goeddel *et al* y 4,810,648 sacado el 7 de marzo de 1989 a stalker.

El polinucleótido puede ser añadido a una gran variedad de otras secuencias de ADN para la introducción en un portador apropiado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del portador, de la manera de la introducción del ADN en el portador, y si el mantenimiento episomal o de la integración es deseado.

De manera general, el polinucleido es insertado en un vector de expresión, tal como el plasma, en orientación y la estructura de lectura correcta para la expresión.

Si es necesario, el ADN puede ser ligado a un promotor apropiado. Promotores bacteriales incluyen promotores *E. coli* *lacI* y *lacZ*, promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, promotores *page* PR y PL, el promotor *foA* y el promotor *trp*. Promotores Eucarióticos incluyen el promotor inmediato inicial CMV, el promotor quinasa timidina HSV, los promotores inicial y terminal SV40 y los promotores de LTRs retroviral. Otros promotores que convienen serán conocidos al especialista cualificado.

La expresión contenida construye también de manera deseable lugares para la iniciación de transcripción y terminación, y en la región transcrita, un lugar de ribosoma ligante para traducción. (Hastings *et al*, International Patent No. WO 98/16643).

El vector es luego introducido en el portador a través técnicas estandaradas. Generalmente, no todos los portadores serán transformados por el vector y por consiguiente va a ser necesario seleccionar para células portadoras transformadas.

Una técnica seleccionada incluye incorporar en el vector de expresión el marcador de la secuencia ADN, con cualquier elemento de control necesario, se codifica para un rasgo seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen reductasa dihidrofate, G418 o resistencia neomicyna para la cultivo de una célula eucariotica, y tetracyclin, kanamycin o genes resistentes para cultivo en *E. coli* y otra bacteria.

De manera alternativa, el gen para tal rasgo seleccionado puede ser u otro vector, lo cual es utilizado para co-transformar la célula portadora deseada.

Células portadoras que han sido transformadas por el ADN recombinante de la invención son después cultivadas durante un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas conocidas a los especialistas de las técnicas reveladas en eso para permitir la expresión de un polipéptido, que puede ser luego recuperado.

El anticuerpo o componente puede ser recuperado y purificado de cultivos de células recombinadoras con métodos bien conocidos incluyendo sulfato de amonio o precipitación etanol, extracción ácida, cromatografía de cambio de anión y catión, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbico, cromatografía de afinidad, cromatografía hidroxilapatita, y cromatografía lectina.

De manera preferible, el líquido de cromatografía de alta eficacia ("HPLC") es empleada para la purificación.

Un decimoquinto aspecto de la invención facilita una línea de célula portadora estable produciendo un anticuerpo como se describió en el quinto, sexto u octavo aspectos de la invención, o un componente como definido en el décimo aspecto de la invención en el que el anticuerpo y la fracción citotóxico son polipéptidos que son fusionables, resultante de la incorporación en la línea de célula un polinucleótido como se definió en el séptimo, noveno, y decimoprimer aspectos de la invención, o un vector como se definió en el decimotercero aspecto de la invención.

Un decimosexto aspecto de la invención facilita un componente farmacéutico de formulación que comprende un anticuerpo como se define en los quinto, sexto, octavo aspectos de la invención, o un polinucleótido como se define en los séptimo, noveno y undécimo aspectos de la invención, o un componente como se define en los décimo o decimosegundo o decimotercero aspectos de la invención, y un portador farmacéutico aceptable.

Por "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una formulación estéril y libre de pirogeno. Portadores que convienen farmacéuticamente son muy bien conocidos en el dominio de la farmacia.

Los portadores tienen que ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el componente de la invención y no nocivos a los recipientes de aquellos. Típicamente, los portadores serán agua o salina que serán estériles y sin pirogeno, sin embargo, otros portadores aceptables pueden ser utilizados.

ES 2 357 609 T3

En una fabricación, los componentes farmacéuticos o formulaciones de la invención son para administraciones similares, mas preferiblemente para administración intravenosa.

5 En una fabricación preferida, la composición farmacéutica conviene para administración intravenosa a un paciente, por ejemplo por inyección.

10 Formulaciones para una administración similar incluye inyección estéril acuosa y no acuosa que pueden contener anti-oxidantes, buffers, solutos bacteriostáticos que da la formulación isotónica con la sangre de un recipiente deseado; y suspensiones estériles acuosas y no-acuosas que puede incluir agentes de suspensión y agentes densificantes.

10 En una fabricación alternativa preferida, la composición farmacéutica es adecuada para una administración tópica a un paciente.

15 De manera preferible, la formulación es una dosificación conteniendo una dosificación diaria o única, una subdosificación diaria o una fracción apropiada en su salida, del ingrediente activo.

20 El anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención será administrado normalmente de manera oral o por otra forma similar, en la forma de una formulación farmacéutica que comprende un ingrediente activo, de manera optativa en la forma de una dosificación aceptable farmacéuticamente orgánica no-tóxica, o inorgánica, ácido, o básico, de sal añadida. Dependiendo de la dificultad para curar al paciente, tanto como las vías de administración, las composiciones pueden ser administradas con varias dosificaciones.

25 En una terapia humana, el anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención puede ser administrado solo pero será generalmente administrado en como mezcla con un excipiente farmacéutico que contiene, diluyente o un portador selecto respecto a la ruta seguida de administración y de practica normalizada farmacéutica.

30 Por ejemplo, el anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención puede ser administrado de manera oral, bucal, o sublingual en forma de pastillas, capsulas, óvalos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes sabores o colorantes, para aplicaciones inmediatas, atrasadas, o de emisiones controladas. El anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención también puede ser administrado por inyección intracavernosa.

35 Tales pastillas pueden contener excipientes tal y como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonata de calcio, fosfato de calcio dibasico y glicina, desintegrantes como almidón (de manera preferible maíz, patata o almidón de tapioca), glicolato de almidón de sodio, sodio de croscarmellosa y ciertos silicatos complejos, y ligantes granulationes tal y como polivinilpyrrolidona, oolvinylnpyrrolidona, hydroxypropylmethylcelulosa (HPMC), hydroxypropylcellulosa (HPC), sacrosa, gelatina y acacia.

40 Añadimos, agentes lubricantes tal y como estearato de magnesio, ácido estearato, glicerol behenato y talco puede ser incluido.

45 Composiciones sólidas de un tipo similar pueden también ser empleados tal y como llenado en capsulas de gelatina. Los excipientes preferidos según esto incluye lactosa, almidón, celulosa, leche con azúcar o peso molecular grande de polietileno glicol. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los componentes de la invención puede ser combinados con varios agentes dulces saboradores, agentes colorantes o pigmentados, con agentes suspensivos emulsificante y con diluyentes tal y como agua, etanol, glicol propileno y glicerina, y combinaciones de esos.

50 El anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención puede también ser administrado por técnicas de infusión. Son mejor utilizados en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, bastantes sal o glucosa para hacer la solución isotónica con sangre. La solución acuosa tendría que convenir a un buffer ácido base (de manera preferible de un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones similares se cumple según las condiciones establecidas por técnicas normalizadas farmacéuticas bien conocidas por los especialistas en el campo.

55 Las formulaciones que contienen administraciones similares incluyen inyecciones de soluciones estéril acuosas y no-acuosas que pueden contener anti-oxidantes, buffer, bacteriostatos y soluciones que fomentan la formulación isotónico con la sangre del recipiente destinado; suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes floculantes y agentes espesantes. Las formulaciones pueden ser presentadas en dosificación por unidad o por envases multi-dosificación, por ejemplo ampollas cerradas, y ser mantenido bajo condiciones congeladas y secas (liofilizado) que requieren solamente en añadido del líquido portador estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente utilizada previamente. Soluciones de inyección improvisada y suspensiones pueden ser preparados de polvos estériles, granulas y pastillas como descrito anteriormente.

65 Para una administración oral y parental a pacientes humanos, el nivel de dosificación diaria del anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención serán utilizados normalmente de 1 a 1000 mg por cada adulto (i.e de mas o menos 0,015 a 15/Kg), administrado en única o dividida dosificaciones.

Por consiguiente, por ejemplo, las pastillas o capsulas del anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención puede contener de 1 mg a 1000 mg de un agente activo para una administración sola o de dos o mas veces en el mismo

tiempo, como apropiado. El doctor, en cualquier evento determinara la dosificación actual que será mas conveniente para cualquier paciente individual y variara con el año, peso y reacción de un paciente particular. Las dosificaciones de arriba son ejemplos para el caso medio. Se puede, claro, ser ejemplos individuales donde variedad de dosificación más alta o baja lo merecen y tales son dentro de la esfera.

5

El anticuerpo polinucleótido o componente de la invención puede también ser administrado intranasal o por inhalación y son entregados convenientes en la forma de un polvo seco de inhalación o un spray aerosol que es un contenedor presurizado, bomba, spray o nebulizador con el uso de un propulsor que conviene, e.g. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoro-etano, a hidrofluoroalcano como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A), 10 134A, o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EAc), dióxido de carbono u otro gas que conviene. En el caso de un aerosol presurizado, la dosificación por unidad puede ser determinada facilitando una válvula para entregar una cantidad medida. El contenedor presurizado, bomba, espray o nebulizador puede contener una solución o suspensión del componente activo e.g. utilizando una mezcla de etanol y el propulsor como solvente, que puede tener adicionalmente un lubricante, e.g. trioleato sorbitano. Capsulas y cartucho (hechos por ejemplos, a partir de gelatina) para utilizar en un inhalador o insuflador puede ser formulados para contener un polvo mixto de un componente de la invención y una 15 base de polvo que conviene como lactosa o almidón.

Formulaciones de aerosol y de polvo seco son preferiblemente arreglados de tal manera que cada dosificación o “soplo” contiene al menos 1 mg de un anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención para la entrega al 20 paciente. Será apreciado que en conjunto una dosificación a diario con un aerosol variará de una sola dosificación o, mas a menudo, en dosificaciones divididas a lo largo del día.

De manera alternativa, el anticuerpo, polinucleótido o componente de la invención puede ser administrado en la forma de un supositorio o pesario, o pueden ser aplicados actualmente en forma de una loción, la solución, la nata, el 25 unguento o el quita polvo.

Los compuestos de la invención también pueden ser transdérmicamente administrados, por ejemplo, por el empleo de un pedazo de piel. Ellos también pueden ser administrados por la vía ocular, en particular para tratar las enfermedades del ojo.

30

Para el empleo oftálmico, el anticuerpo, el polinucleótido o el compuesto de la invención pueden ser formulados como suspensiones micromisadas en isotónico, pH se ajustó, la salina estéril, o, preferentemente, como soluciones en isotónica, pH la salina ajustada, estéril, opcionalmente en combinación con un preservativo (conservante) como un cloruro benzylalconio. O bien, ellos pueden ser formulados en un unguento como petrolatum.

35

Para el uso actualmente a la piel, el anticuerpo, el polinucleótido o el compuesto de la invención pueden ser formulados como un unguento conveniente que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con más de lo siguiente: aceite mineral, líquido petrolatum, petrolatum blanco, glicol de propileno, polyoxyethylene polyoxypropileno compuesto, emulsionando cera y agua. O bien, ellos pueden ser formulados como una loción conveniente o la nata, suspendidos o disueltos en m por ejemplo una mezcla con mas de lo siguiente: lo 40 siguiente: aceite mineral, sorbitan monoestearato, un polietileno glicol, parafina líquida, polysorbato 60, cetil cera de esterres, cetearil alcohol, 2-octyldecanol, benzyl alcohol y agua.

Las formulaciones convenientes para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base condimentada, por lo general sacarosa y acacia o tragacanth; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y la boca lava a la comprensión del ingrediente activo en un conveniente portador líquido.

Un decimoséptimo aspecto de la invención facilita el uso de un anticuerpo como definido en el quinto, sexto, octavo aspectos de la invención, o un polinucleido como definido en el séptimo, noveno, y decimouno aspectos de la invención, o un compuesto como definido en el décimo o decimodos aspectos de la invención, en la preparación de un medicamento para inhibir el angiogénesis.

Las condiciones que implican angiogénesis no esperados o no-deseable son descritos arriba.

55

En una fabricación, polipéptidos, como anticuerpos, pueden ser entregados utilizando un sistema de suministro de liberación sostenida de medicina inyectable. Son designadas específicamente para reducir la frecuencia de inyecciones. Un ejemplo de tal sistema es Nutropin Depot que encapsula hormonas de crecimiento humanas recombinantes. (rhGH) en microsferas biodegradables que, una vez rechazados, libera rhGH despacio durante un periodo sostenido.

60

El polipéptido puede ser administrado por un dispositivo implantado que libera la medicina directamente al lugar requerido. Por ejemplo Vitrasert libera ganciclovir directamente en el ojo para curara la retinis CMV. La aplicación directa de este agente tóxico a lugar de enfermedad para alcanzar una terapia eficaz sin los efectos sistémicos importantes de la medicina. Un dispositivo que libera una corriente eléctrica a las células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al medicamento, resultando en una estimulación de le entrega de medicina intracelular. 65

ES 2 357 609 T3

Polipéptidos también pueden ser entregados por electroincorporación (EI). El actúa cuando pequeñas partes de hasta 30 micrones de diámetro en la superficie de la piel experimenta pulsos eléctricos idénticos o similares a los utilizados en electrocoporación. En EI, estas partículas son dirigidas a través de un corneum stratum y dentro de capas profundas sillerías de la piel. Las partículas pueden ser recargadas o recubiertas con medicina o genes o pueden actuar simplemente como “bullets” que genera poros en la piel a través de donde la medicina puede entrar.

Un método alternativo de entrega de polipéptido es el sistema inyectable ReGel que es termo-sensible. Por debajo de la temperatura del cuerpo, ReGel es un líquido inyectable mientras que a la temperatura del cuerpo se forma inmediatamente un envase de gel que se eroda despacio y se disuelve en polymers conocidos, seguros, y biodegradable. El medicamento activo es entregado en cuanto se disuelvan los biopolímeros.

Polipéptidos farmacéuticos también pueden ser entregados de manera oral. El proceso emplea un sistema oral para absorción de vitaminas B12 en el cuerpo para co-entrar proteínas y péptidas. Por conducir el sistema de absorción, la proteína o péptida puede moverse a través de una pared intestinal. Los complejos son sintetizados entre los análogos de B12 y el medicamento que conserva ambas afinidades significantes para el factor intrínseca (IF) en la porción de vitamina B12 del complejo y bioactividad de una porción de droga en el complejo.

Polinucleótidos pueden ser administrados por cualquier método eficaz, por ejemplo, de manera parental (ej: de manera intravena, subcataneal, intramuscular) o por vía oral, nasal o otros métodos que permiten los oligonucleótidos de acceder y circular en el flujo sanguíneo del paciente. Se dan Polinucleótidos administrados sistemáticamente y de manera preferible añadidos a los polinucleótidos administrados localmente, pero también tienen utilidad en la ausencia de una administración local. Una dosis desde 0,1 a cerca de 10 gramos por cada administración a un adulto humano serán eficaces para este propósito de manera general.

El polinucleótido puede ser administrado como una construcción genética conveniente como descrita encima y entregada al paciente donde se necesita. Típicamente, el polinucleótido en la construcción genética es ligado a un portador que puede expresar el anticuerpo o compuesto en la célula.

Aunque las construcciones genéticas para la entrega de polinucleótidos puede ser ADN o ARN, es preferible si es ADN.

De manera preferible, la construcción genética es adoptada para el suministro de célula humana.

Medios y métodos para introducir una construcción genética en una célula en un cuerpo de un animal son bien conocidos. Por ejemplo, las construcciones de la invención pueden ser introducidas dentro de células por cualquier método conveniente, por ejemplo métodos implicando retrovirus, así que la construcción es insertada en el genoma de la célula. Por ejemplo, en Kuriyama *et al* (1991) Cell Struc. And Func. 16, 503-510 retrovirus purificados son administrados El ADN retroviral construye un polinucleótido como descrito arriba puede ser hecho utilizando métodos bien conocidos en dominio. Para producir activos retrovirus desde tal construcción es usual utilizar un ecotropic psi2 que contiene células crecidas a Dulbecco, modificadas en Eagle médium (DMEM) conteniendo 10% de serum de fetal de becerro (FCS). Traslado de una línea celular es conveniente por fosfato de coprecipitación de calcio, y transformantes estables son elegidos por adición de G418 a una concentración final de 1 mg/ml (suponiendo que la construcción retroviral contiene un gen neoR). Colonias independientes son aisladas y expendidas y el cultivo eliminado, filtraba con un filtrador de 0,45 μ m de tamaño de poros y mantenía a -70 grados. Para la introducción de un retrovirus en las células tumores, es conveniente inyectar directamente un sobrenante retroviral al cual 10 ug/ml de polibrene ha sido añadido. Para tumores excedentes 10 mm de diámetro es apropiado inyectar entre 0,1 y 1 ml de sobrenadante; de manera preferible 0,5 ml.

De manera alternativa, como se describe en Culver *et al.* (1992) Science 256, 1550-1552, las células que producen retrovirus son inyectados. El retrovirus creando células introducidas son fabricadas para producir activamente partículas retroviral de manera que esta producción continuada del vector ocurrió dentro de la masa *in situ* de tumor. Por consiguiente, células proliferantes epidemiales pueden ser exitosamente transmutada *in vivo* si son mezcladas con células de vector produciendo retro viral.

Retrovirus en el objetivo también están disponible para el uso en la invención; por ejemplo, secuencias conferando afinidades de ligantes específicos puede ser creado en un viral pre-existiendo env genes (see Miller y Vile (1995) Faseb J.9, 190-199 para una revisión de esto y otro vectores en el objetivo para la terapia de gne).

Otros métodos incluyen una entregada simple en la construcción en la célula para expresión con límite de tiempo o, siguiendo la integración en el genoma, para un tiempo mas largo. Un ejemplo de la próxima presentación incluye liposomas (Nassander *et al* (1992) Cancer Rs. 52, 646-653).

Para la preparación de inmuno-liposomas MPB-PE (N-(4-(p-maleimidofenil)butiril)-fosfatidiletanolamina) es sintetizado según el método de Martin y Papadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286-288. MPB-PE es incorporado al bicapa liposomal para permitir una unión covalente con el ADN o otra construcción genérica de la invención para la entregada a las células del objetivo, por ejemplo, formándose dicho liposoma en una solución del DNA o otra construcción genérica, seguida por exclusión secuencial a través de membrana de filtro de policarbonata con 0,6 μ m y 0,2 μ m de tamaño de poros bajo la presión de nitrógeno hasta 0,8 MPa. Después de la extrusión, la construcción de ADN

inmovilizado es separado de la construcción de ADN libre por ultra centrifugación a 80000x g para 45 min. Frescamente preparado, MPB-PE-liposomas en un amortiguador deoxigenado son mezclados con anticuerpos preparados (o fragmento por consiguiente) y las reacciones de la unión son llevados en un atmósfera de nitrógeno a 4 grados bajo rotación constante toda la noche. Los inmunoliposomas son separados de anticuerpos no-conjugados por ultracentrifugación a 80000 xg durante 45 minutos. Inmunoliposomas pueden ser inyectados intraperitonealmente o directamente en una tumor.

Otros métodos de entrega incluyen adenovirus trayendo ADN externo vía un puente anticuerpo-polilisina (ver Curiel Prog. Med. Virol. 40, 1-18) y polication conjugado como portadores (Wagner *ET AL* (1990) pROC. nATL. acad. Sci. USA 87, 3410-3414). En primero de esos métodos, un anticuerpo-polication complejo es formado con la construcción AND o otra construcción genética de la invención, en el cual el anticuerpo es específico para el adenovirus de tipo salvaje o un adenovirus cambiante en el cual un nuevo epítipo ha sido introducido lo cual liga el anticuerpo. La fracción de amplificación se liga al ADN vía interacciones electrostáticas con la estructura de fosfato. El adenovirus, porque contiene fibra no- alterada y proteínas de penton, es internalizado en la célula y trae en la célula con la construcción ADN de la invención. Es preferido si el polication es polilisina.

El polinucleótido puede también ser entregado por adenovirus en el cual está presente dentro de la partícula de adenovirus, por ejemplo, como se describe arriba.

En un método alternativo, una gran eficacia del sistema de entrega del ácido nucleico que usa endocitosis medida receptor para traer macromoléculas de ADN en células es empleado. Se cumple que por conjugado de la proteína de transporte de hierro en la célula. Las construcciones transferina-polication y el ADN o otras construcciones genéticas de la invención son facilitadas a las células tumores, y se espera un gran nivel de expresión de la construcción en las células.

La entrega de gran eficacia del receptor medido de las construcciones del ADN o otras construcciones genéticas de la invención utilizando la actividad de rotura de endosoma de partículas de adenovirus defectivas o inactivas químicamente producidas por los métodos de Cotten *et al* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6094-6098 también pueden ser utilizados. Este estudio parece confiar en el hecho de que adenovirus son adaptados para permitir liberar de su ADN de un endosoma sin pasar a través de lisosoma, y en presencia de, por ejemplo, transferina ligada a la construcción de la DNA otra construcción genérica de la invención, la construcción es seguida por las células por el mismo rutas que la partícula de adenovirus.

Este estudio tiene la ventaja que no se necesita utilizar construcciones retrovirales complejas; no hay modificación permanente del genoma como ocurrido con la infección retroviral; y el sistema de la expresión del objetivo es unido con un sistema de entrega.

Sistemas de entrega alternativas también son conocidos tal y como el sistema de adenovirus modificado descrito en WO 94/10323 donde, típicamente, el ADN es traído dentro del adenovirus, o adenovirus-parecido, partícula. Michael *et al* (1995) Gene therapy 2, 660-668 describe la modificación del adenovirus para añadir una fracción de célula selectiva dentro de una fibra de proteína. Los adenovirus mutantes que replican a selectivamente en ip53-células humanas tumorosa deficiente, tal y como los que están descritos en BIschoff *et al* (1996), Science 274, 373-376 también son útiles para la entrega de la construcción genética de la invención a un célula. Por consiguiente, será apreciado que un aspecto adicional de la invención facilita un virus o algo parecido a un virus incluyendo una construcción genético de la invención. Otros virus que convienen, vectores virales o algo parecido a partículas de virus incluye vectores lentivirus y lentivirales, HSV, virus de adeno asistado (AAV) y vectores basado en AAV, vaccínea y parvovirus.

La construcción genética de la invención puede ser preparada utilizando métodos muy bien conocidos en el dominio.

Un decimonoveno aspecto de la invención facilita un método *in vitro* de inhibe el angiogénesis incluyendo la administración de un anticuerpo como descrito en el quinto, sexto u octavo aspecto de la invención, o un polinucleótido como definido en el séptimo noveno, y décimo uno aspectos de la invención o un compuesto como definido en el décimo o decimosegundo aspectos de la invención, a tejido o células *in vitro*.

Un vigésimo aspecto de la invención facilita un método de producción de un anticuerpo como definido en el quinto, sexto u octavo aspecto de la invención, o un compuesto como definido en el décimo aspecto de la invención donde el anticuerpo y la fracción de citotóxico son polipéptidos que son usados, el método incluyendo expresión de un polinucleótido como definido en el séptimo aspecto de la invención, o cultivando una línea de célula anfitrión estable como definido en el decimoséptimo aspecto de la invención.

También hemos demostrado que el fragmento extracelular de MR (residuos 1-467, figura 2B, SEQ ID NO: 3, también conocidos como ectodominio MR) inhibe la migración de células endoteliales, incluyendo bFGF, y VEGF migración inducida.

De manera interesante, el MR ectodominio no aparece afectar el apego de la célula endotelial (datos no mostrados). Ectodominio MR, y los fragmentos de esto muestra la actividad inhibitoria en el HUVEC análisis de migración, serían

ES 2 357 609 T3

predichos de ser útil terapéuticamente en condiciones en las que no deseables, no queridos o migración de célula endotelial inapropiada contribuye a la patología.

5 También hemos demostrado que el ectodominio de MR inhibe la proliferación de células endoteliales. El ectodominio MR, y fragmentos de esto muestran una actividad anti-proliferativa en un ensayo como descrito en el ejemplo 5, sería predicho para ser útil terapéuticamente en condiciones en las cuales, no queridos, no deseables o inapropiados proliferaciones de células endoteliales contribuye a la patología.

10 Un vigesimoprimer aspecto de la invención facilita el uso de un ectodominio MR, o un fragmento que por supuesto que inhibe la célula endotelial en migración y/o proliferación, en la preparación de un medicamento para combatir cualquier enfermedad o condición implicando no querido o no-deseable o inapropiado proliferación y/o migración endotelial.

15 Es deseable cuando, en una fabricación, “un fragmento del ectodominio del MR que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial” puede inhibir la migración de la célula endotelial y no la proliferación de célula endotelial, o puede inhibir la proliferación de la célula endotelial y no la migración de la célula endotelial.

20 En una fabricación alternativa “un fragmento del ectodominio del MR que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial” puede inhibir ambos migración y proliferación de célula endotelial. En esta fabricación, el fragmento del ectodominio del MR no inhibe necesariamente ambos proliferación y/o migración de la célula endotelial a la misma altura.

25 Por “inhibición endotelial de la migración y/o proliferación de la célula endotelial” se incluye el sentido de reducción la tasa o el nivel de la migración y/o proliferación de la célula endotelial. La reducción puede ser de un nivel bajo de cerca de 10%, o cerca de 20% o, 30% o 40% de la tasa o del nivel de la migración y/o proliferación de la célula endotelial. De manera preferible, la reducción es media de cerca de 50% o 60% o 70% 80% de reducción de la tasa o del nivel de la proliferación y o la migración de la célula endotelial. De manera mas preferible, la reducción es grande de cerca de 90% o 95% o 99% o 99.99% de la tasa o del nivel de la migración y o proliferación de la célula endotelial. Mas preferiblemente la inhibición puede también incluir la eliminación de la migración y/o la proliferación de la célula endotelial, o reduciendo hasta un nivel no detectable.

30 Métodos y ensayos para determinar la tasa o el nivel de la migración de la célula endotelial, y por lo tanto para determinar si y hasta que punto cualquier fragmento particular del ectodominio MR inhibe la migración de la célula endotelial, son conocidos en el dominio y incluyen el ensayo HUVEC descrito en el ejemplo 4. Similarmente, métodos y ensayos para determinar la tasa o el nivel de la proliferación de célula endotelial y por lo tanto, para determinar si y hasta que punto cualquier fragmento particular del MR inhibe la proliferación de la célula endotelial, so muy conocidos en el dominio incluye el ensay HHUVEC descrito en el ejemplo 5.

35 Por “un fragmento del ectodominio de MR que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial” se incluye el ectodominio de MR que ha sido truncado o suprimido, o un polipéptido incluyendo al menos 450 residuos de ácidos amino contiguos del ectodominio de MR, lo cual es suficiente para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial. De manera preferible, un fragmento del ectodominio lo que es suficiente para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial incluye al menos 400, o al menos 350 o 300, o 250 o 200 o 150 o 100 o 90, o 80, o 70, o 60, o 50, o 40, o 30, o 20, o 15 o 10 residuos ácidos aminos contiguos del ectodominio del MR. Es mas preferible, particularmente si el fragmento del ectodominio que es suficiente para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial incluye al menos 60 residuos de ácidos aminos contiguos del ectodominio de MR. La inhibición de la migración y/o de la proliferación de la célula endotelial puede ser examinada, por ejemplo, utilizando el ensay HUVEC como descrito en los ejemplos 4 y 5.

40 En una fabricación, el fragmento del ectodominio lo cual es suficiente para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial consiste o incluye la región Ig de MR (residuos 46-209, SEQ ID NO: 4).

45 En otra fabricación, el fragmento del ectodominio, lo cual es suficiente para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial consiste o incluye el dominio IgA de MR (residuos 46-116, SEQ ID NO: 5) el dominio IgB de MR (residuos 15-209, SQ ID NO: 6).

50 Hemos demostrado que el ectodominio MR no parece inhibir el pegado endotelial de la célula (datos no mostrados) y, preferiblemente, el fragmento del ectodominio lo cual es suficiente para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial no inhibe el conjunto de la célula endotelial.

55 Por consiguiente el ectodominio MR, o fragmento que inhibe la migración de la célula endotelial, puede ser utilizada para inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial sin inhibir el conjunto de la célula endotelial.

60 Un vigesimoquinto aspecto de la invención facilita un ectodominio MR o un fragmento que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial, para uso medicinal.

65 Ha sido demostrado que la masa de tejido de adiposo puede ser regulado por su vasculatura (Rupnick, M.A. *et al* (2002) PNAS USA 99 (16): 10730-10735). Además, leptina, un regulador conocido de apetencia y de metabo-

lismo, es también conocido para modular ambos migración de células endoteliales (Goetze, S. *et al* (2002) *Hyper-tension* 40 (5): 748-754) y angiogénesis (Sierra Honigmann, M.R *et al* (1998) *Science* 281: 1683). De allí que la inhibición de la migración de las células endoteliales puede reducir la masa de tejido adiposo y ser útil para curar la obesidad.

5 Enfermedades o condiciones implicando no-queridas, no deseables e inapropiadas migración y/o la proliferación de la célula endotelial, incluyen tumores/canceres, psoriasis, aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis (ambos inflamatorio y reumatoide), degeneración macular, enfermedad de Paget, retinopatía y sus complicaciones vasculares (incluyendo proliferia, prematurada, y retinopatía diabética), proliferaciones vasculares benignas, fibrosas, obesidad e inflamación.

10 La invención también incluye el uso del ectodominio MR, o un fragmento que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial, en la preparación de un medicamento para combatir una enfermedad o una condición selecta de tumores/cáncer, psoriasis, aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis (ambos inflamatorio y reumatoide), degeneración macular, la enfermedad de Paget, complicaciones de retinopatía y sus vasculares (incluyendo proliferaria y prematurada, y retinopatía diabética), proliferaciones vasculares benignas, fibrosas, obesidad, e inflamación en un individuo.

15 Un aspecto posterior de la invención facilita un método *in vitro* de inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial incluyendo la administración del ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial, de los tejidos o células *in vitro*. Las células pueden estar establecidas en líneas de células, o células que han sido sacadas de un individuo. Los tejidos o células son de manera preferible tejidos o células, y de manera preferible son tejidos humanos o células.

20 Además, es apreciado que la administración de un ácido nucleico codificando el fragmento extracelular de MR o de los fragmentos activos de eso, podrían también ser útil terapéuticamente.

25 Un aspecto posterior de la invención facilita el uso de un polinucleótido codificando el ectodominio MR o un fragmento de eso que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial, en la preparación de un medicamento para combatir cualquier enfermedad o condición implicando no queridas, no-deseables o inapropiadas migración y/o la proliferación de la célula endotelial.

30 Un aspecto posterior de la invención facilita un método *in vitro* de inhibición de la migración y/o la proliferación de la célula endotelial incluyendo la administración de un polinucleótido codificando el ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe la migración y/o la proliferación de la célula endotelial, al tejido o a las células *in vitro*. Las células pueden estar establecidas en líneas de células, o células que ha sido sacadas de un individuo. El tejido o células son de manera preferible tejido o células mamíferita, y mas preferiblemente son tejido o células humanas.

35 Las preferencias para formulaciones farmacéuticas, y a continuación, son las mismas en el aspecto de la invención dirigida a inhibir la migración y/o la proliferación de la célula endotelial utilizando el ectodominio MR o un fragmento de es como las preferencias descritas encima para los aspectos de la invención dirigidas a los anticuerpos anti-MR.

40 También hemos demostrado que el ectodominio MR es suficiente para inhibir la formación de tráquea de brote *in vitro* en el ensayo de anillo aórtico, y *en vivo* el ensayo de compresa de angiogénesis. Además, fragmentos (por ejemplo los que son hechos de manera recombinante o por la síntesis de péptido *de novo*) de la región extracelular de MR que muestra la actividad inhibitoria en el ensayo del anillo aórtico del rata o del ensayo de compresa de angiogénesis también proveerá ser útil en la inhibición del angiogénesis.

45 Un aspecto posterior de la invención facilita un método *in vitro* de la inhibición del angiogénesis incluyendo la administración del ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe el angiogénesis, en la preparación de un medicamento para inhibir el angiogénesis.

50 Un aspecto posterior de la invención facilita un método *in vitro* de la inhibición del angiogénesis incluyendo la administración del ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe el angiogénesis, a tejido o células *in vitro*.

55 Por "fragmento del ectodominio MR que inhibe el angiogénesis" se incluye el ectodominio MR que ha sido truncado o borrado, o un polipéptido incluyendo al menos 450 residuos de ácidos aminos contiguos del ectodominio MR, lo cual es suficiente para inhibir el angiogénesis. Mas preferiblemente, un fragmento del ectodominio lo cual es suficiente para inhibir el angiogénesis incluye al menos 400, o 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 residuos de ácidos aminos contiguos del ectodominio MR. Es particularmente mas preferible, si el fragmento del ectodominio lo cual es suficiente para inhibir el angiogénesis puede ser examinado, por ejemplo, utilizando el ensayo del anillo aórtico como descrito en el ejemplo 2 o el ensayo de la compresa como descrito en el ejemplo 3.

60 En una fabricación, el fragmento del ectodominio lo cual es suficiente para inhibir el angiogénesis consiste en o incluye el dominio IgA o MR (residuos 46-116, SEQ ID NO: 5) o el dominio IgB de MR (residuos 151-209, SEQ ID NO: 6).

ES 2 357 609 T3

Además, es apreciado que la administración de un ácido nucleico codificando el fragmento extracelular de MR o el fragmento activo de eso, también sería un método útil de terapia anti-angiogénesis.

5 Otro aspecto posterior facilita el uso de un polipéptido codificando el ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe el angiogénesis, en la preparación de un medicamento para inhibir el angiogénesis.

10 Un otro aspecto posterior de la invención facilita un método *in vitro* de inhibir el angiogénesis incluyendo la administración de un polipéptido codificando el MR ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe el angiogénesis, a tejido o células *in vitro*.

Las preferencias para enfermedades o condiciones a ser combatidas, son las mismas en los aspectos dirigidos al ectodominio MR, o un fragmento de eso que inhibe el angiogénesis, como las preferencias descritas encima para los aspectos de la invención dirigidas al los anticuerpos anti-MR.

15 La lista o la discusión de un documento previamente publicado en esta especificación no sería necesariamente tomado como un conocimiento que el documento es parte de la técnica o es conocimiento generalmente conocido.

La invención ahora será descrita con mas detalles por referencias con el siguiente ejemplo y figuras.

20 Figura 1A muestra la secuencia de ADN del anexo utilizado para generar plásmido 1 (SEQ ID NO: 1). Figura 1B muestra la secuencia de ácido amino por el anexo (SEQ ID NO: 2). Esta secuencia es el tamaño total de la secuencia de ácido amino.

25 Figura 2A muestra la secuencia ADN del anexo utilizado para generar el plásmido NH10 (SEQ ID NO: 30). La figura 2B muestra la secuencia de ácido amino codificada por el anexo utilizado para generar plásmido NH10. Esta secuencia es designada como el ectodominio y es la secuencia de ácido amino del fragmento extracelular entero de MR (residuos 1-467, SEQ ID NO: 3).

La figura 3 muestra la secuencia de ácido amino de la región Ig de MR (residuos 46-209, SEQ ID NO: 4).

30 La figura 4A muestra la secuencia de ácido amina del dominio IgA de MR (residuos 46-116, SEQ ID NO: 5). La figura 4B muestra la secuencia de ácido amino del dominio IgB de MR (residuos 151-209, SEQ ID NO: 5).

La figura 5 muestra una representación de la estructura de MR.

35 La figura 6A es un gráfico y una tabla mostrando el efecto del anticuerpo (MR-7) y el dominio extracelular soluble) de MR (MR Ecto) en formación de nuevos vasos en el ensayo del anillo aórtico.

40 La figura 6B es un gráfico y una tabla mostrando el efecto del dominio extracelular soluble de MR (el ectodominio MR, el ecto MR) en formación de nuevos vasos en el ensayo del anillo aórtico con un control IgG humano.

45 La figura 7 muestra la formación de brote desde una aorta de rata en la presencia de un anticuerpo soluble del dominio extracelular MR. Las secciones de aorta de la rata han sido cultivadas durante 5 días en la presencia de un media sola (A), o de mitad de cantidad de 100 ug/ml MR-7 de anticuerpo (B), o 15 ug/ml del dominio extracelular de MR (residuos 1-467) (C). Cuatro dibujos son mostrados para cada grupo de tratamiento y son representadas con niveles de brotes de aortas duplicadas.

50 La figura 8 es un gráfico y una tabla mostrando el efecto del dominio extracelular soluble de MR (ectodominio de MR) en formación de nuevos vasos de sangre en el ensayo de la compresa de angiogénesis.

La figura 9A es un gráfico y una tabla mostrando que el factor de crecimiento del vascular endotelial (VEGF) produce la migración de células endoteliales humanas primeras y es inhibitasa por el dominio extracelular MR.

55 La figura 9B es un gráfico y una tabla mostrando que el factor de crecimiento del fibroblasto básico (Bfgf) produce la migración de células endoteliales humanas primarias es inhabitada por el dominio extracelular MR.

La figura 10 es un gráfico y una tabla mostrando que el ectodominio MR (Robo4-Fc) inhibe la proliferación de células endotelianes humanas primarias.

60

65

ES 2 357 609 T3

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos

5 EL c ADN construye como ha sido utilizado como descrito en tabla 2:

TABLA 2

10

Longitud total MR cADN	Figura 1
MR ectodominio-FC	Figura 2
MR IgA + B-Fc	Figura 3
15 MR IgA-Fc	Figura 4

15

20 “Fc” se refiere a la región Fc del vector pIG. Es el bisagra de los dominios constantes del IgG humano, CH1, CH2, dentro de los extremos vectores (sitio de clonaje múltiplo y junta de acceptor de región incluida). La secuencia nucleótida del vector es:

25

```
AAGCTTGATATCGAATTCTGCAGCCCGGGGATCCGGAGGGAGGG
TGCTGCTGGAAGCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGG
CTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCCGTCTGCCTC
30 TTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGG
TCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGC
CCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAG
35 ACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAAGC
CCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTC
40 TCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAGC
45 CAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTA
```

45

50

55

60

65

ES 2 357 609 T3

GAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACG
TCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTCAACTCCTGGGGGGACCGTC
5 AGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA
10 GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC
15 TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAG
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTG
20 GGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCT
GCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCTACAGGGCAGCC
25 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGCCATGACCTG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
30 ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
35 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGC
GACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTTCGCACGACC
40 ATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCAT
GGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCGAGACTGTG
45 ATGGTTCTTTCCACGGGTACCCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCAT
GAGGGAGGCAGCGGCCGCGACTCTAG (SEQ ID NO: 31).

50 Generación de vectores de plásmidos N1 y NH10 para generación de anticuerpos anti-MR utilizando inmunización eran llevados como siguientes. Los vectores plásmidos N1 y NH10, codificando N1 (lazo de membrana) y NH10 (soluble), eran generados como siguientes:

55 N1 era generado para sacar del tamaño entero de MR pBluescript KS + por un digesto notI. El producto era limpiado con el gel y ligado al pcDNA3 (lo cual había sido gigestado con NotI).

NH10 era generado para ampliar el dominio extracelular de MR utilizando primeros que incorporaban un sitio 5' HinDIII y un SITIO 3' Ntl. Eso era ligado en un vector pcDNA3 que había sido digerido con las mismas enzimas.

60 La inmunización genética de los ratones para generar anticuerpos anti-MR eran llevados como sigue:

65 La construcción N1 y NH10 eran utilizados para inmunizar ratones desde tres estructuras genéticas diferentes según el método descrito en (Boyles, J.S, A. Silva *et al* (1997) "La inmunización del ADN: la inducción de un anticuerpo ávido y el efecto en la ruta de la célula T de citotoxicidad". Proc Natl Acad Sci USA 94 (26): 14626-31). Los ratones eran inmunizados con una inyección intramuscular de 100 ug de plásmido libre de endotoxina. Una vez cada dos semanas. Siguiendo la inmunización con las construcciones de ADN, se las inyectaba a cada uno de los ratones 200 ul

ES 2 357 609 T3

de ectodominio MR purificado de manera intravenal, como un ultimo estimulante antes del calmo de la cosecha para generar los hibridomas. Tres diferentes tensiones de ratones eran testados por su habilidades a generar una respuesta inmunitaria conveniente a la inmunización genética, como mostrado en Tabla 3.

5

TABLA 3

Grupo	Inmunización con N1	Inmunización con NH10
Grupo B-Balb/c ratones	B1-B5	B6-B10
Grupo C- C57B1 ratones	C1-C5	C6-C10
Grupo M-MFI ratones no sanguíneos	M1-M5	M6-M10

15

El anexo para inmunización es mostrado en Tabla 4.

20

TABLA 4

	Día
Pre sangrado	-2
1ª Inmunización I/M	0
2ª Inmunización I/M	14
3ª Inmunización I/M	28
Test sanguíneo	35
I/V propulsor con células o proteína ul de 129 ug/ml purificada proteína ECSM4 I/V en PBSa	59
Sacrificio de ratones y retirada del bazo por fusión	63

35

Durante la inmunización, la sangre testimonio era ensayado para un anticuerpo anti-MR utilizando la captura ELISA siguiente. Esta ELISA es un ensayo robusto y flexible que puede ser utilizado para mesurar el nivel de la fusión de la proteína en sobrenadante o presencia/nivel de un anticuerpo a la proteína de fusión en sobrenadante hibridoma. Es muy sensible, detectando un IgG humano en una escala de 0.001 a 0.5 ug/ml. Tiene poco heritancia, típicamente en la región de OD405 = 0.07. En comparación, sobrenadantes hibridoma netos en este sistema (MR-pIG) da resultados positivos de OD405 > 1.0 (y en algunos casos >2.0).

40

45 *Resumen del método ELISA*

La capa de la placa con 5 ug/ml cabra anti-humano IgG Fc-específica; bloca con 1% BSA en PBS; añadir sobrenadante fusión proteína o control humano de IgG; añadir detección de anticuerpo o cabra anti-humana alcalina fosfatasa conjugue; añadir segunda conjugación si una detección de anticuerpo no conjugada no es Utilizada; añadir pNPP substrato; dejar con 3M NaOH después de 20-30 minutos.

50

Protocolo detallado para capturar ELISA pasa proteínas fusionas pIG

55

(1) La capa de placa con 2 a 5 ug/ml cabra-anti-humana IgG (Fc-específica) anticuerpo purificado no conjugado diluido en PBS, e.g. Sigma I-2136. 50 ul/pocillo, una tapa para asegurar aun cobertura de base de pocillo.

60

(2) Incubar toda la noche a 4 grados C. Los platos pueden ser mantenidos así para al menos una semana, mientras que son guardados en un contenedor con aire humidificado para impedir el secado.

(3) Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 (0.04 Tween 20) por inundación del plato y secarlo con un pañuelo de tejido cada vez.

65

(4) Bloquear con 1% BSA in PBS, 200 ul/pocillo. Incubar en una temperatura de cámara durante 1-2 horas, o toda la noche a +4 grados C. Los platos pueden ser almacenados bloqueados a +4 grados C, para el punto (2) encima.

(5) Repetir la etapa de limpieza (etapa 3).

ES 2 357 609 T3

(6) Tapa de plato con la fusión de proteína sobrenadante e.g. MR-ecto-pIg. El sobrenadante contiene 0.5 a 1.0 ug/ml fusión proteína da un resultado muy fuerte, entonces no es necesario purificar o concentrar. Incubar 1 hora en la temperatura de una cámara. El IgG humano puede ser utilizado en vez de un sobrenadante como control positivo para detectar el dominio Fc y tirado para cuantificar la suma de NABA-pIg proteína fusión presenta en el sobrenadante.

(7) Repetir la etapa de limpieza (etapa 3).

(8) Detectar el dominio pIg utilizando cabra anti-humana IgG -alcalina fosfatasa conjugación, 175000 dilución en PBS (control positivo), o suero de ratón desde un test de sangre, varios diluciones en PBS (1/10 a 1/1000). Incubar 1 hora a temperatura de la cámara. Esto es seguido por una etapa adicional de un conjugado secundario (anti-ratón-alcalina fosfatasa). Incubar durante 1 hora más en la temperatura de una cámara.

(9) Repetir la etapa de limpieza (etapa 3). (También entre el uso de la detección de anticuerpo y de la conjugación secundaria, si un método alternativo es usado).

(10) Medida d el cambio de color utilizando Sigma pNPP substrato hecho de tabletas, 50 ul/pocillo. Incubar durante 20-30 minutos. En la oscura y después dejar la reacción por el añadido de 50 ul/pocillo 3M NaOH. Leer el cambio de color a 405 nm.

Los anticuerpos anti-MR eran generados como siguientes: los bazos cultivados de los ratones inmunizados eran fusionados a las células NSO. El hibridomas resultante eran testados para su habilidad a generar anticuerpos que reconoce MR utilizando ELISA. De los anticuerpos identificados, uno era elegido para demás estudios. -MR7.

El anticuerpo MR7 era caracterizado como siguiente: MR7 era testado para su habilidad a reconocer varios dominios de MR utilizando ELISA. Se descubrió que el MR7 reconoce el dominio MR IgA. La secuencia de ADN codificando las regiones complementarias determinantes (CDRs) de MR7 era determinado por amplificación del PCR y técnicas de secuencias estandartes utilizando los primeros mostrados abajo.

Primeros

Una mezcla de once 5' primeros (listados en tabla 5) era utilizado para amplificar la cadena kappa CDRs.

TABLA 5

Iniciador	Secuencia
MKV1	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG (SEQ ID NO: 32)
MKV2	ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT (SEQ ID NO: 33)
MKV3	ACTAGTCGACATGAGTGTGGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG (SEQ ID NO: 34)
MKV4	ACTAGTCGACATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCT TG (SEQ ID NO: 35)
MKV5	ACTAGTCGACATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC (SEQ ID NO: 36)
MKV6	ACTAGTCGACATGAGGTKCCYTGYTCAGYTYCTGRGG (SEQ ID NO: 37)
MKV7	ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWWG G (SEQ ID NO: 38)
MKV8	ACTAGTCGACATGTGGGGAYCTTKTYAMMTTTTTCAATTG (SEQ ID NO: 39)
MKV9	ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG (SEQ ID NO: 40)
MKV10	ACTAGTCGACATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT (SEQ ID NO: 41)
MKV11	ACTAGTCGACATGGAAGCCCCATGCTCAGCTTCTCTTCC (SEQ ID NO: 42)

La primera secuencia que amplificaba el fin de la cadena MR7 kappa 5' era MK5.

La secuencia de los 3 'primeros era GTTTGATCTAGAGCTTGGTCCC (SEQ ID NO: 43) que amplifica de después CDR3 y añade un sitio de restricción al fin del producto se necesitan clonar el producto. El mismo producto era también producido cuando la mezcla 5' era utilizada con el 3' primer región constante TTGGAGGCGTTATC CACCT (SEQ ID NO: 44).

ES 2 357 609 T3

Cadena pesada primers

El 5' primer era:

5 ATCGGATCCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG (SEQ ID NO: 45),

y el 3' primer era:

10 CTCGAATTCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC (SEQ ID NO: 46).

El código redundante para estos primeros es mostrado en tabla 6.

TABLA 6

IUB código ambiguo

<u>Nucleotides</u>	<u>Code</u>	
A+C	M	aMino
A+G	R	purina
A+T	W	débil
C+G	S	Fuerza
C+T	Y	pYrimidine
G+T	K	Keto
A+G+C	V	no T
A+C+T	H	no G
A+G+T	D	no C
C+G+T	B	no A
A+G+C+T	N	cualquiera

Secuencia MR7

40 La secuencia de ácido amina de la luz y regiones pesada del anticuerpo MR7 es dado abajo. Los CDRs son subrayados.

MR7 kappa V región:

45 Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S
V S Y M Y W Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S
50 G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K (SEQ ID
55 NO: 12).

MR7 pesada región V:

60 Q V K/Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G
Y S L T D Y N L N W V K Q N K G K S L E W I G V I N P
N Y G T T S Y N Q K F K G K A T L T V D Q S S S T T Y
65 M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R G R D Y F G Y W
G Q G T T V T V S S (SEQ ID NOs: 16-17),

ES 2 357 609 T3

La secuencia de nucleótida codificando la luz y las regiones pasadas V del anticuerpo MR7. Los CDRs son subrayados.

MR7 kappa V región:

CAA,ATT,GTT,CTC,ACC,CAG,TCT,CCA,GCA,CTC,ATG,TCT,GCA,TCT,
CCA,GGG,GAG,AAG,GTC,ACC,ATG,ACC,TGC,AGT,GCC,AGC,TCA,AGT,
GTA,AGT,TAC,ATG,TAC,TGG,TAC,CAG,CAG,AAG,CCA,AGA,TCC
,TCC,CCC,AAA,CCC,TGG,ATT,TAT,CTC,ACA,TCC,AAC,CTG,GCT,TCT
,GGA,GTC,CCT,GCT,CGC,TTC,AGT,GGC,AGT,GGG,TCT,GGG,ACC,TC
T,TAC,TCT,CTC,ACA,ATC,AGC,AGC,ATG,GAG,GCT,GAA,GAT,GCT,G
CC,ACT,TAT,TAC,TGC,CAG,CAG,TGG,AGT,AGT,AAC,CCA,CTC,ACG,
TTC,GGT,GCT,GGG,ACC,AAG,CTG,GAG,CTG,AAA (SEQ ID NO: 21).

MR7 región pesada V:

CAG,GTC,AAG(orA/CAA),CTG,CAG,GAG,TCA,GGA,CCT,GAG,CTG,GT
G,AAG,CCT,GGC,GCT,TCA,GTG,AAG,ATA,TCC,TGC,AAG,GCT,TCT,G
GT,TAC,TCA,CTC,ACT,GAC,TAC,AAC,CTG,AAC,TGG,GTG,AAG,CAG,
AAC,AAA,GGA,AAG,AGC,CTT,GAG,TGG,ATT,GGA,GTA,ATT,AAT,C
CA,AAC,TAT,GGT,ACT,AGT,TAC,AAT,CAG,AAG,TTC,AAG,GGC,AAG
,GCC,ACA,TTG,ACT,GTA,GAC,CAA,TCT,TCC,AGC,ACA,ACC,TAC,AT
G,CAG,CTC,AAC,AGC,CTG,ACA,TCT,GAG,GAC,TCT,GCA,GTC,TAT,T
AC,TGT,GCA,AGA,GGG,AGG,GAT,TAC,TTC,GGC,TAC,TGG,GGC,CAA
,GGG,ACC,ACG,GTC,ACC,GTC,TCC,TCA (SEQ ID NOs: 25-27).

Ejemplo 2

El anticuerpo MR7 y el ectodominio MR (fragmento extracelular de los residuos MR 1-467) inhiben la formación de brotes de vasos en el ensayo del anillo aórtico

Resumen

El papel del MR en el angiogénesis fue investigado utilizando el ensayo del anillo aórtico de la rata. Segmentos de la aorta de la rata eran insertados en Matrigel y tratado con el anticuerpo MR7 o con la proteína ectodominio MR. Los vasos brotes eran autorizados desarrollar en los cinco días antes de rayado por tres observadores independientes. Le media de los resultados de cerca de 20-25 experiencias separadas son demostradas en figura 6A y 6B. Los inter-resultados de fiabilidad era estimada utilizando el método de Landis y Koch. Los valores de peso de kappa calculados eran 0.96 para MR7 y 0.93 para el ectodominio MR. Estos valores de kappa muestran que hubo un gran grado de consistencia entre los resultados independientes.

Métodos

Las aortas eran cosechadas con ratas de 200 g-300 g (viejo de 6-8 semanas). E inmediatamente colocado en MCDB 131 media.

ES 2 357 609 T3

El tejido de conexión se quito y las aortas cortadas en anillo de 1 mm-1,5 mm. 48 platos eran recubiertos con 110 ul de Matrigel (BD Biosciences) diluido 1:1 con PBS y permitido de gel a 37 grado C para 30 minuto. Los anillos eran colocados en los pozos y encerrado con una superposición de 40 ul de Matrigel. Los anticuerpos (100 ug/ml) o ectodominio MR (dominio extracelular robo 4 soluble) (15 ug/ml) era añadidas a los pozos en un volumen final de 250
5 ul de MCDB 131 media conteniendo 20% de suero bovino fetal y 50 ug/ml de suplemento de crecimiento de célula endotelial. Media fue cambiado después de dos días y las aortas analizadas y fotografiadas después de cinco días.

Resultados

10 Fotomicrografías Reprensorias de segmentos de los anillos aórticos son mostrados en Figura 7 A-C. Como lo muestra la figura, la cura de los anillos aórtico con MR7 o electrodominio MR resultaron en decrecimiento importante en el brote de vasos desde el segmento aórtico.

15 Análisis estadísticas del ensayo del anillo aórtico

Los anillos aórticos eran grabados según el crecimiento del vaso en la escala de 0 (bajo) a 4 (alto) como lo siguiente: 0 = no crecimiento, 1 = pocos vasos, 2 = vasos intermediarios, 3 = numerosos vasos pero centros de brotes esporádicos alrededor del anillo y 4 = numerosos vasos de brotes de todas las regiones del anillo.

20 Todos los experimentos eran probados de manera secreta y por 3 investigadores independientes. La fiabilidad antepruebas era estimada utilizando el método de Landis y Kosch 8 Bimetrics, 1977, 33 (1), 159-174). El peso de la kappa era calculado con el objetivo de establecer la fiabilidad del inter-tasa del examinador. Kappa pesado es dado por:

$$25 \quad K_{pw} = \frac{P_{o(w)} - P_{e(w)}}{1 - P_{e(w)}}$$

30 Donde $p_o(w)$ y $p_e(w)$ son los pesos observados y acuerdos esperados calculados con las formulas:

$$35 \quad P_{o(w)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^g w_{ij} f_{ij}$$

$$40 \quad P_{e(w)} = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^g w_{ij} r_i c_j$$

45 El i representa la categoría para el examinador y j represente la categoría del segundo examinador. El r_i represente el gran total de casos en a categoría i para un examinador, y c_j representa el gran total de casos en categoría j para el otro examinador.

50 La diferencia entre las categorías consideradas de ser 1. Por consiguiente con la introducción de nuevas categorías para la descripción de la transición adicional la diferencia de una categoría a otra se consideró como siendo 0.5 puntos. El nombre total de categorías por consiguiente es $g = 9$. El nombre de casos es $n = 80$.

El peso w_{ij} para la secuencia observada f_{ij} de los casos que fueron en categoría i por un examinador y en categoría j para su segundo examinador es calculado como:

$$55 \quad w_{ij} = 1 - \frac{|i - j|}{g - 1}$$

60 La fuerza del acuerdo era visto como pobre mientras que los pobres de la estadística. Era < 0.00 , ligera para valores 0.00-0.20, justo para 0.21-0.40, moderado para 0.41-0.60, substancial para 0.61-0.80 y gran para 0.81-1.00.

65 Los datos eran después calatos juntos analizados por ANOVA y el método Kruskall Wallis. Los valores p resultantes muestran una diferencia de alta importancia entre el grupo control y los tratados con MR7 o electrodominio.

ES 2 357 609 T3

Ejemplo 3

El ectodominio MR (fragmento extracelular de los residuos MR 1-467) inhibe la formación de brotes de vasos in vivo

5 La habilidad del ectodominio MR a inhibir el angiogénesis *in vivo* fue probado utilizando un ensayo de compresa de angiogénesis (Hori Y. *et al* (1996) "Efectos diferentes de los esteroides y dexametasona en los angiogénesis y los niveles de citoquina en los implantes de compres de rata" Br. J Pharmacol. 118 (7): 1584-1591) preformado en un ratón hembra negra C57. Todos los ratones recibieron una compresa subcutánea estéril de polieter (tip 611-9) disco (15x5x5 mm) bajo de la piel dorsal en el día 0. Reactivos probados fueron inyectados a través de la piel directamente en las compresas cada dos días durante 21 días. (100 ul volumen de inyección). Grupos de dos ratones recibieron control PBS; 10 ng/ml de factor de crecimiento básico fibroplasta (bFGF); o 10 ng/ml bFGF + 100 UG/MR ectodominio MR. Los animales eran sacrificados en el día 21 y las compresas fueron quitadas, fijadas en 3.7% paraformaldeyde e insertado de parafina. Secciones de micrón eran manchados con haematoxylin y eosin y fotos digitales sacadas utilizando un microscopio Zeiss Axioskop 2 plus con una cámara digital Axioacam con magnificación 20x. El número de vasos invadiendo las compresas fueron contadas como media de angiogenesis.

Eran claras las diferencias entre las compresas de los ratones que recibieron inyección con Bfgf solo (controles) y los que recibieron inyección con ambos bFGF y ectodominio MR. Las diferencias fueron:

- 20 a) Los números de vasos eran de manera importante pocos en las compresas tratados de ectodominio MR comparando al control (Figura 8; $p = 0,0014$ utilizando el t-test de estudio;
- b) Una ausencia de muy largos vasos de las compresas tratadas de ectodominio MR; y
- 25 c) La densidad de célula fibroplastia era mucho menos en las compresas tratadas de ectodominio MR.

Ejemplo 4

30 *El ectodominio MR (fragmento extracelular de residuos MR 1-467) inhibe la migración de células endoteliales vasculares humanas primarias*

Una prueba de migración de célula endotelial vascular humana primaria (HUVEC) fue realizada utilizando el método BD Bio Coat TM El sistema de angiogénesis para una migración de célula endotelial lo cual es disponible como Catalog No. 354143 de BD Biosciences, Bedford, MA, USA. Las instrucciones para utilizar este kit se pueden encontrar en http://www.bdbiosciences.com/_discovery_labware/Products/_drugdiscovery/insert_systems/_angiogenesis_system/pdf/_Endothelial_Cell_Migration_Instruct.pdf. Este sistema utiliza un multi-pozo de 24 inserte sistema y consiste en un BD Falcon FluoroBlok PET membrana con tres tamaños de poros de micrones cubiertos uniformemente en el lado encima con fibronectina. La cuantificación de la migración de la célula es acabada por post-etiqueta de células con los colorantes fluorescentes Calcein AM y medida de la migración de las células fluorescentes en un plato de lectura fluorescente. La membrana de fluoroBlok bloca los pasajes de luz de manera efectiva desde 490-700 nm a > 99% de eficacia significando que las celtas etiquetadas que no han migrada son bloqueadas de la detección.

La cámara superior fue sembrado con 50,000 HUVEC/pozos en MCDB 131 suplementado de médium con 1% de suero de feto de ternero inactivado de calor (FCS). El fondo de la cámara fue recargada con o sin bFGF (5 ng/ml), VEGF (10 ng/ml) y MR ectodominio (100 ug/ml) en 750 ul de MCDB 131 + 1% FCS. Después de 22 horas de incubación a 37 grados C, las membranas insertas fueron manchadas con 4 ug/ml Calcein AM (Pruebas moleculares) en una solución sal balanceada madeja (HBSS) para 90 minutos. Fluorescente en el lado del fondo de la membrana fue medida a la excitación/emisión del tamaño de las olas de 485/530 nm. Imágenes fueron sacadas utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 145 con una cámara digital Axioacam de magnificación de x10.

Ambos nFGF y VEGF son conocidos para estimular la migración de células endoteliales (Cross y Claesson-Welsh, 2001 Trends Fannacl Sci. 22(4): 201-207). Como mostrado en figuras 9 A y 9 B, el ectodominio MR fue mostrado de inhibir de manera importante la migración de células HUVEC inducida por ambos bFGF o VEGF.

55

Ejemplo 5

El ectodominio MR (fragmento extracelular de residuos de MR 1-467) inhibe la proliferación de la célula endotelial

60

5x 10⁴ células endoteliales vasculares humanas primarias (HUVEC) eran sombrados con pozo de un plato de pozo 6- en 1.5 ml tratamiento de crecimiento entero media (6.25, 12.5, 25, 50 o 100 ug/ml del ectodominio MR (Robot 4 -Fc) o 100 ug/ml IgG humano), o no tratamiento como control. Después de cuatro días de incubación a 37 C grados, las células fueron limpiadas en PBS y destacadas de los pozos por añadido de 1 ml de solución trypsin. Después de que todas las células se separaron, 400 ul de la suspensión de célula fue transferido a 19.6 ml de buffer Isoton (Beckman Coulter), y el numero d células en cada mostrador fue determinado en una cuenta de Particle Coulter y analiser de tamaño (Beckman Coulter). La experiencia fue llevada entriplicada, y replicadas tres veces.

65

ES 2 357 609 T3

Como mostrado en la figura 10, la incubación en la presencia de 12.5 ug/ml MR ectodominio bajo la proliferación de células HUVEC en un mas o menos 75% d niveles de control, y de grande concentraciones de ectodominio MR tuvo un fuerte efecto anti-prolifératelo muy importante.

5

Ejemplo 6

Tratamiento de un paciente exhibiendo un angiogenesis no deseable por administrar un anticuerpo que se liga específicamente a la región extracelular de MR

10

Un paciente exhibiendo no deseables angiogenesis es curado con infusiones intravenosas de soluciones salinas de una composición farmacéutica incluyendo un anticuerpo que específicamente se liga a la región extracelular de MR. Las infusiones son administradas cada semana durante un periodo de 3 a 6 meses.

15

Ejemplo 7

Tratamiento de un paciente exhibiendo no deseables angiogenesis por administrar la región extracelular de MR

20

Un paciente exhibiendo no deseable angiogenesis es curado con infusiones intravenosas de soluciones salinas de una composición farmacéutica incluyendo el ectodominio MR. Las infusiones son administradas cada semana, típicamente para 3 o 6 meses.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 357 609 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un anticuerpo que se liga selectivamente a residuos de aminoácidos 46 a 209 del magic roundabout (MR) humano (SEQ ID NO: 2) en la preparación de una medicina para inhibir angiogénesis.

2. Método *in vitro* de inhibición de angiogénesis que comprende la administración de un anticuerpo que se liga selectivamente a residuos aminoácidos 46 a 209 del MR humano (SEQ ID NO: 2) a un tejido o células *in vitro*.

10 3. Método o uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo se liga selectivamente a los residuos 46 a 116 del MR humano, o a los residuos 151 a 209 del MR humano.

4. Método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera incorporando los CDR siguientes:

15 CDR1: SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 9);
CDR2: L T S N L A S (SEQ ID NO: 10), et
CDR3: Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11).

20 5. Método o uso según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera incluyendo la secuencia de ácidos aminados.

25 Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S
V S Y M Y W Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S G
V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T
30 Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K (SEQ ID NO:
12) .

35 6. Método o uso según cualquier de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena pesada incluyendo los CDR siguientes:

40 CDR1: D Y N L N (SEQ ID NO: 13);
CDR2: V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14); et
CDR3: G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15).

45 7. Método o uso según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena pesada conteniendo la secuencia de ácidos aminados

50 Q V K / Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y
S L T D Y N L N W V K Q N K G K S L E W I G V I N P N Y
G T T S Y N Q K F K G K A T L T V D Q S S S T T Y M Q L
N S L T S E D S A V Y Y C A R G R D Y F G Y W G Q G T T
55 V T V S S (SEQ ID NO: 16-17) .

60 8. Método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el anticuerpo tiene al menos una región variable de cadena ligera como definida en la reivindicación 4 o 5 y al menos una región variable de cadena pesada como definida en la reivindicación 6 o 7.

9. Uso de un polinucleótido codificando un anticuerpo como definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

65 10. Método *in vitro* de inhibición de la angiogénesis, que comprende la administración de un polinucleótido codificando un anticuerpo como definido en cualquier de las reivindicaciones 1 a 8 a un tejido o a células *in vitro*.

ES 2 357 609 T3

11. Un anticuerpo que se liga selectivamente a los residuos de aminoácidos 46 a 209 del MR humano (SEQ ID NO: 2) y que contiene las secuencias de ácidos aminados i) a iii), las secuencias de ácidos aminados iv) a vi) o las secuencias de ácidos aminados i) vi):

- 5
i) S A S S S V S Y M Y (SEQ ID NO: 9);
ii) L T S N L A S (SEQ ID NO: 10);
iii) Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11);
iv) D Y N L N (SEQ ID NO: 13);
10 v) V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14);
vi) G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15).

15 en donde las secuencias de ácidos aminados i) a iii) corresponden a CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena ligera y las secuencias de ácidos aminados iv) a vi) corresponden a CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena pesada.

12. Un anticuerpo según la reivindicación 11 teniendo al menos una región variable de cadena ligera incorporando los CDR siguientes:

- 20 CDR1: S A S S S V S Y M Y (SEQ ID NO: 9);
CDR2: L T S N L A S (SEQ ID NO: 10); et
25 CDR3: Q Q W S S N P L T (SEQ ID NO: 11).

13. Un anticuerpo según la reivindicación 12 teniendo al menos una región variable de cadena ligera conteniendo la secuencia de ácidos aminados

30
Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S
V S Y M Y W Y Q Q K P R S S P K P W I Y L T S N L A S G
35 V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T
Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K (SEQ ID NO:
40 12)

14. Un anticuerpo según la reivindicación 11 teniendo al menos una región variable de cadena pesada incorporando los CDR siguientes:

- 45 CDR1: D Y N L N (SEQ ID NO: 13);
CDR2: V I N P N Y G T T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 14); et
CDR3: G R D Y F G Y (SEQ ID NO: 15).

15. Un anticuerpo según la reivindicación 14, teniendo al menos una región variable de cadena pesada conteniendo la secuencia de ácidos aminados.

55 Q V K / Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y
S L T D Y N L N W V K Q N K G K S L E W I G V I N P N Y
G T T S Y N Q K F K G K A T L T V D Q S S S T T Y M Q L
60 N S L T S E D S A V Y Y C A R G R D Y F G Y W G Q G T T
V T V S S (SEQ ID NO: 16-17).

65 16. Un anticuerpo según la reivindicación 11 teniendo al menos una región variable de cadena ligera según la reivindicación 12 o 13 y al menos una región variable de cadena pesada según la reivindicación 14 o 15.

ES 2 357 609 T3

17. Un anticuerpo que se liga selectivamente al epítipo de MR ligado por un anticuerpo teniendo al menos una región variable de cadena ligera kappa según la reivindicación 13 y al menos una región variable de cadena pesada según la reivindicación 15.

5 18. Un polinucleótido codificando un anticuerpo según cualquier de las reivindicaciones 11 a 17.

19. Un polinucleótido según la reivindicación 18, conteniendo una o varias de las secuencias nucleótidas:

- 10 i) AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC (SEQ ID NO: 18) ;
ii) TCT CAC ATC CAA CCT GGC TTC T (SEQ ID NO: 19);
iii) CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA CTC ACG (SEQ ID NO: 20);
iv) GAC TAC AAC CTG AAC (SEQ ID NO: 22)
v) GTA ATT AAT CCA AAC TAT GGT ACT AGT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GGC (SEQ ID NO: 23); et
15 vi) GGG AGG GAT TAC TTC GGC TAC (SEQ ID NO: 24).

20. Un polinucleótido según la reivindicación 18 o 19 que contiene la secuencia nucleótida

20 CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA CTC ATG TCT GCA TCT
CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT
25 GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA AGA TCC TCC
CCC AAA CCC TGG ATT TAT CTC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA
GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC
30 TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT
TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA CTC ACG TTC GGT
GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA (SEQ ID NO: 21) ,

35 y/o

comprendiendo la secuencia nucleótida

40 CAG GTC AAG (ou A/CAA) CTG CAG GAG TCA GGA CCT GAG CTG
GTG AAG CCT GGC GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT
45 GGT TAC TCA CTC ACT GAC TAC AAC CTG AAC TGG GTG AAG CAG
AAC AAA GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA GTA ATT AAT CCA
AAC TAT GGT ACT AGT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC
50 ACA TTG ACT GTA GAC CAA TCT TCC AGC ACA ACC TAC ATG CAG
CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT
55 GCA AGA GGG AGG GAT TAC TTC GGC TAC TGG GGC CAA GGG ACC
ACG GTC ACC GTC TCC TCA (SEQ ID NO: 25-27) .

60 21. Un anticuerpo que se liga selectivamente a los residuos 46 a 209 del MR humano (SEQ ID NO: 2) pero que no se liga selectivamente a los péptidos LLQPPARGHAHDGQALSTDL (SEQ ID NO: 2) o LSQSPGAVPQALVAWRA (SEQ ID NO: 29).

65 22. Un anticuerpo según la reivindicación 21, que se liga selectivamente a los residuos 46 a 116 del MR humano (SEQ ID NO: 2) pero que no se liga selectivamente al péptido LLQPPARGHAHDGQALSTDL (SEQ ID NO: 28), o que se liga selectivamente a los residuos 151 a 209 del MR humano (SEQ ID NO: 2) pero que no se liga selectivamente al péptido LSQSPGAVPQALVAWRA (SEQ ID NO 29).

ES 2 357 609 T3

23. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo según la reivindicación 21 o 22.

24. Un compuesto que comprende un anticuerpo según cualquier de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22 y una fracción directamente o indirectamente citotóxica.

5

25. Compuesto según la reivindicación 24, en donde el grupo citotóxico es seleccionado entre un agente químico-terapéutico directamente citotóxico, un polipéptido directamente citotóxico, una fracción que es capaz de convertir un profármaco relativamente no-tóxico en un fármaco citotóxico, un radiosensor, un ácido nucleico directamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido directamente o indirectamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico, o un átomo radioactivo.

10

26. Un compuesto según la reivindicación 25 en donde el átomo radioactivo es cualquiera entre el fósforo 32, el yodo 125, el yodo 131, el indio 111, el renio 186, el renio 188 o el ytrio 90.

15

27. Un compuesto según la reivindicación 24 o 25, en el cual el anticuerpo y la fracción citotóxica son polipéptidos que están fusionados.

28. Un polinucleótido codificando un compuesto según la reivindicación 27.

20

29. Un compuesto que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22 y una fracción fácilmente detectable.

25

30. Un compuesto según la reivindicación 29 en el cual la fracción fácilmente detectable contiene una cantidad apropiada de cualquiera entre el yodo 123, el yodo 131, el indio 111, el flúor 19, el carbono 13, el nitrógeno 15, el oxígeno 17, el tecnecio 99m, el gadolinio, el manganeso o el hierro.

31. Vector que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 18, 20, 23, o 28.

30

32. Una célula huésped que contiene el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o el vector según la reivindicación 31.

35

33. Una línea de células huéspedes estables produciendo un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22 o un compuesto según la reivindicación 27 resultando de la incorporación en la línea celular de un polinucleótido exógeno según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o un vector según la reivindicación 31.

40

34. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22, o un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 o 29 a 30, y un soporte farmacéutico aceptable.

45

35. Una composición farmacéutica según la reivindicación 34 adecuada para la administración a un paciente por inyección.

50

36. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22, o un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 o 29 a 30, para un uso médico.

55

37. Uso de un anticuerpo según cualquier de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22, o de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o de un compuesto según cualquier de las reivindicaciones 24 a 27 o 29 a 30, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

60

38. Un método *in vitro* de inhibición de la angiogénesis, que comprende la administración de un anticuerpo según cualquier de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22, o de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 o 29 a 30, a un tejido o células *in vitro*.

65

39. Método de producción de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 o 21 a 22, o de un compuesto según la reivindicación 27, el método comprendiendo la expresión de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, 23 o 28, o cultivo de una línea de células huéspedes estables según la reivindicación 33.

70

40. Uso de un anticuerpo que se liga selectivamente a los residuos a 46 a 209 del MR humano (SEQ ID NO: 2) en la preparación de un medicamento para combatir una enfermedad o una afección elegida entre tumores/cáncer, psoriasis, aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis (tanto inflamatoria como reumatoide), degeneración macular, enfermedad de Paget, retinopatía y sus complicaciones vasculares (incluyendo proliferativas y de prematuridad, y retinopatía diabética), proliferaciones vasculares benignas, fibrosis, obesidad e inflamación.

ES 2 357 609 T3

5 41. Uso del ectodominio de MR (SQ ID NO: 3) o un fragmento de éste que inhibe la migración y/o la proliferación de células endoteliales, o de un polinucleótido codificando el ectodominio de MR o de fragmento de éste que inhibe la migración y/o la proliferación de células endoteliales, en la preparación de un medicamento para combatir una enfermedad o afección que implica migración y/o proliferación involuntaria, indeseable o inapropiada de células endoteliales.

10 42. Uso según la reivindicación 41 en donde la enfermedad o la afección que implica una migración y/o una proliferación involuntaria, indeseable o inapropiada de células endoteliales elegida entre tumores/cáncer, psoriasis, aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis (tanto inflamatoria como reumatoide), degeneración macular, enfermedad de Page, retinopatía y sus complicaciones vasculares benignas, fibrosis, obesidad e inflamación.

15 43. Método *in vitro* de inhibición de migración y/o de proliferación de células endoteliales, que comprende la administración de la ectodominio de MR o de un fragmento de éste que inhibe la migración y/o la proliferación de células endoteliales, de un polinucleótido codificando el ectodominio de MR o de un fragmento del mismo que inhibe la migración y/o la proliferación de células endoteliales, a un tejido o células *in vitro*.

44. Uso del ectodominio de MR, o de un fragmento de éste que inhibe la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

20 45. Un uso del ectodominio de MR, o de un fragmento de éste que inhibe la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para combatir una enfermedad o una afección elegida entre tumores/cáncer, psoriasis, un aterosclerosis, menorragia, endometriosis, artritis (tanto inflamatoria como reumatoide), degeneración macular, enfermedad de Paget, retinopatía y sus complicaciones vasculares (incluyendo proliferativas y de prematuridad, y retinopatía diabética), proliferaciones vasculares benignas, fibrosis, obesidad e inflamación.

25 46. Método *in vitro* de inhibición de la angiogénesis, que comprende la administración del ectodominio de MR, o de un fragmento de éste que inhibe la angiogénesis, a un tejido o células *in vitro*.

30 47. El uso de un polinucleótido que codifica el ectodominio de MR, o de un fragmento que inhibe la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

48. Método *in vitro* de inhibición de la angiogénesis, que comprende la administración de un polinucleótido codificando el ectodominio de MR, o de un fragmento de éste que inhibe la angiogénesis, a tejido o células *in vitro*.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1A

NotI site

GCGGCCGCGAATTTCGGCACGAGCAGCAGGACAAAGTGCTCGGGACAAGGACATAG
 GGCTGAGAGTAGCCATGGGCTCTGGAGGAGACAGCCTCCTGGGGGGCAGGGGTTT
 CCTGCCTCTGCTGCTCCTGCTCATCATGGGAGGCATGGCTCAGGACTCCCCGCCC
 CAGATCCTAGTCCACCCCCAGGACCAGCTGTTCCAGGGCCCTGGCCCTGCCAGGA
 TGAGCTGCCAAGCCTCAGGCCAGCCACCTCCACCATCCGCTGGTTGCTGAATGG
 GCAGCCCCCTGAGCATGGTGCCCCCAGACCCACACCACCTCCTGCCTGATGGGACC
 CTTCTGCTGCTACAGCCCCCTGCCCGGGACATGCCACGATGGCCAGGCCCTGT
 CCACAGACCTGGGTGTCTACACATGTGAGGCCAGCAACCGGCTTGGCACGGCAGT
 CAGCAGAGGCGCTCGGCTGTCTGTGGCTGTCCCTCCGGGAGGATTTCCAGATCCAG
 CCTCGGGACATGGTGGCTGTGGTGGGTGAGCAGTTTACTCTGGAATGTGGGCCGC
 CCTGGGGCCACCCAGAGCCCACAGTCTCATGGTGGAAAGATGGGAAACCCCTGGC
 CCTCCAGCCCCGGAAGGCACACAGTGTCCGGGGGGTCCCTGCTGATGGCAAGAGCA
 GAGAAGAGTGACGAAGGGACCTACATGTGTGTGGCCACCAACAGCGCAGGACATA
 GGGAGAGCCGCGCAGCCCCGGTTCATCCAGGAGCCCCAGGACTACACGGAGCC
 TGTGGAGCTTCTGGCTGTGCGAATTCAGCTGGAATAATGTGACACTGCTGAACCCG
 GATCCTGCAGAGGGCCCCAAGCCTAGACCGGCGGTGTGGCTCAGCTGGAAGGTCA
 GTGGCCCTGCTGCGCCTGCCAATCTTACACGGCCTTGTTCCAGGACCCAGACTGC
 CCCGGGAGGCCAGGGAGCTCCGTGGGCAGAGGAGCTGCTGGCCGGCTGGCAGAGC
 GCAGAGCTTGGAGGCCTCCACTGGGGCCAAGACTACGAGTTCAAAGTGAGACCAT
 CCTCTGGCCGGGCTCGAGGCCCTGACAGCAACGTGCTGCTCCTGAGGCTGCCGGA
 AAAAGTGCCAGTGCCCCACCTCAGGAAGTGACTCTAAAGCCTGGCAATGGCACT
 GTCTTTGTGAGCTGGGTCCCACCACCTGCTGAAAACCACAATGGCATCATCCGTG
 GCTACCAGGTCTGGAGCCTGGGCAACACATCACTGCCACCAGCCAACTGGACTGT
 AGTTGGTGAGCAGACCAGCTGGAAATCGCCACCCATATGCCAGGCTCCTACTGC
 GTGCAAGTGGCTGCAGTCACTGGTGCTGGAGCTGGGGAGCCCAGTAGACCTGTCT
 GCCTCCTTTTAGAGCAGGCCATGGAGCGAGCCACCCAAGAACCAGTGAGCATGG
 TCCCTGGACCCTGGAGCAGCTGAGGGCTACCTTGAAGCGGCCTGAGGTCATTGCC
 ACCTGCGGTGTTGCACTCTGGCTGCTGCTTCTGGGCACCGCCGTGTGTATCCACC
 GCCGGCGCCGAGCTAGGGTGCACCTGGGCCCAGGTCTGTACAGATATACCAGTGA
 GGATGCCATCCTAAAACACAGGATGGATCACAGTGACTCCAGTGGTTGGCAGAC
 ACTTGGCGTTCCACCTCTGGCTCTCGGGACCTGAGCAGCAGCAGCAGCCTCAGCA
 GTCGGCTGGGGGCGGATGCCCGGGACCCACTAGACTGTCGTGCTCCTTGCTCTC
 CTGGGACTCCCGAAGCCCCGGCGTGCCCCCTGCTTCCAGACACCAGCACTTTTAT
 GGCTCCCTCATCGCTGAGCTGCCCTCCAGTACCCAGCCAGGCCAAGTCCCCAGG
 TCCCAGCTGTCAGGCGCCTCCCACCCAGCTGGCCCAGCTCTCCAGCCCCTGTTC

CAGCTCAGACAGCCTCTGCAGCCGCAGGGGACTCTCTTCTCCCCGCTTGTCTCTG
GCCCCTGCAGAGGCTTGGAAAGGCCAAAAAGAAGCAGGAGCTGCAGCATGCCAACA
GTTCCCCACTGCTCCGGGGCAGCCACTCCTTGGAGCTCCGGGCCTGTGAGTTAGG
AAATAGAGGTTCCAAGAACCTTTCCCAAAGCCCAGGAGCTGTGCCCAAGCTCTG
GTTGCCTGGCGGGCCCTGGGACCGAAACTCCTCAGCTCCTCAAATGAGCTGGTTA
CTCGTCATCTCCCTCCAGCACCCCTCTTTCCTCATGAAACTCCCCCAACTCAGAG
TCAACAGACCCAGCCTCCGGTGGCACCACAGGCTCCCTCCTCCATCCTGCTGCCA
GCAGCCCCCATCCCCATCCTTAGCCCCGTCAGTCCCCCTAGCCCCAGGCCTCTT
CCCTCTCTGGCCCCAGCCAGCTTCCAGTGCCTGTCCAGCTCCTCACTGTCATC
CCTGGGGGAGGATCAAGACAGCGTGCTGACCCCTGAGGAGGTAGCCCTGTGCTTG
GAACTCAGTGAGGGTGAGGAGACTCCCAGGAACAGCGTCTCTCCATGCCAAGGG
CTCCTTCACCCCCACCACCTATGGGTACATCAGCGTCCCAACAGCCTCAGAGTT
CACGGACATGGGCAGGACTGGAGGAGGGGTGGGGCCCAAGGGGGGAGTCTTGCTG
TGCCACCTCGGCCCTGCCTCACCCCCACCCCCAGCGAGGGCTCCTTAGCCAATG
GTTGGGGCTCAGCCTCTGAGGACAATGCCGCCAGCGCCAGAGCCAGCCTTGTGAG
CTCCTCCGATGGCTCCTTCCCTCGCTGATGCTCACTTGGCCCGGGCCCTGGCAGTG
GCTGTGGATAGCTTTGGTTTCGGTCTAGAGCCCAGGGAGGCAGACTGCGTCTTCA
TAGATGCCTCATCACCTCCCTCCCACGGGATGAGATCTTCCCTGACCCCCAACCT
CTCCCTGCCCTGTGGGAGTGGAGGCCAGACTGGTTGGAAGACATGGAGGTCAGC
CACACCCAGCGGCTGGGAAGGGGGATGCCTCCCTGGCCCCCTGACTCTCAGATCT
CTTCCAGAGAAGTCAGCTCCACTGTCGTATGCCCAAGGCTGGTGCTTCTCCTGT
AGATTACTCCTGAACCGTGTCCCTGAGACTTCCAGACGGGAATCAGAACCACTT
CTCCTGTCCACCCACAAGACCTGGGCTGTGGTGTGTGGGTCTTGGCCTGTGTTTC
TCTGCAGCTGGGGTCCACCTTCCCAAGCCTCCAGAGAGTTCTCCCTCCACGATTG
TGAAAACAAATGAAAACAAAATTAGAGCAAAGCTGACCTGGAGCCCTCAGGGAGC
AAAACATCATCTCCACCTGACTCCTAGCCACTGCTTTCTCCTCTGTGCCATCCAC
TCCCACCACCAGGTTGTTTTGGCCTGAGGAGCAGCCCTGCCTGCTGCTCTTCCCC
CACCATTTGGATCACAGGAAGTGGAGGAGCCAGAGGTGCCTTTGTGGAGGACAGC
AGTGGCTGCTGGGAGAGGGCTGTGGAGGAAGGAGCTTCTCGGAGCCCCCTCTCAG
CCTTACCTGGGCCCCCTCCTCTAGAGAAGAGCTCAACTCTCTCCCAACCTCACCAT
GGAAAGAAAATAATTATGAATGCCACTGAGGCACTGAGGCCCTACCTCATGCCAA
ACAAAGGGTTCAAGGCTGGGTCTAGCGAGGATGCTGAAGGAAGGGAGGTATGAGA
CCGTAGGTCAAAGCACCATCCTCGTACTGTTGTCACTATGAGCTTAAGAAATTT
GATACCATAAAATGGTAAAGACTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

NotI site downstream of polyA tail

Figura 1B

1 MGS GGDSLLG GRGSLPLLLL LIMGGMAQDS PPQILVHPQD QLFQGP GPAR
 51 MSCQASGQPP PTIRWLLNGQ PLSMVPPDPH HLLPDGTL LLL LOPPARGHAH
 101 DGQALSTD LG VYTCEASNRL GTAVSRGARL SVAVLREDFQ IQPRDMVAVV
 151 GEQFTLECGP PWGHPEPTVS WWKD GKPLAL QPGRHTVSGG SLLMARA EKS
 201 DEGT YMCVAT NSAGHRESRA ARVSIQEPQD YTEPV ELLAV RIQLENV TLL
 251 NPDPAEGPKP RPAVWLSWKV SGPAAPAQSY TALFRTQTAP GGQGAPWAE E
 301 LLAGWQSAEL GGLHWGQDYE FKVRPSSGRA RGPDSNV LLL RLPEKVP SAP
 351 PQEVT LKPGN GTVFVSWVPP PAENHNGI IR GYQVWSLGNT SLPPANW TVV
 401 GEQTQLEIAT HMPGSYCVQV AAVTGAGAGE PSRPVCL LLE QAMERATQEP
 451 SEHGFWTLEQ LRATLKRPEV IATCGVALWL LLLGTAVCIH RRRRARVHLG
 501 PGLYRYTSED AILKHRMDHS DSQWLADTWR STSGSRDLSS SSSLSSRLGA
 551 DARDPLDCRR SLLSWDSRSP GVPLLPDTST FYGSLIAELP SSTPARPSPQ
 601 VPAVRRLEPQ LAQLSSPCSS SDSLCSRRGL SSPRLSLAPA EAWKAKKKQE
 651 LQHANS SPLL RGSHSLELRA CELGNRGSKN LSQSPGAVPQ ALVAWRALGP
 701 KLLSSSNELV TRHLPPAPLF PHETPPTQSQ QTQPPVAPQA PSSILLPAAP
 751 IPILSPCSP SPQASSLSGP SPASSRLSS SLSSLGEDQD SVLTPEEVAL
 801 CLELSEGEET PRNSVSPMPR APSPTTYGY ISVPTASEFT DMGRTGGGVG
 851 PKGGVLLCPP RPCLTPTPSE GSLANGWGSA SEDNAASARA SLVSSSDGSF
 901 LADAHFARAL AVAVDSFGFG LEPREADCVF IDASSPPSPR DEIFLTPNLS
 951 LPLWEWRPDW LEDMEVSHTQ RLGRGMPPWP PDSQISSQRS QLHCRMPKAG
 1001 ASPVDYS

Figura 2A

HindIII site

AAGCTTAAAGTGCTCGGGACAAGGACATAGGGCTGAGAGTAGCCATGGGCTCTGG
 AGGAGACAGCCTCCTGGGGGGCAGGGGTTCCTGCCTCTGCTGCTCCTGCTCATC
 ATGGGAGGCATGGCTCAGGACTCCCCGCCCCAGATCCTAGTCCACCCCCAGGACC
 AGCTGTTCCAGGGCCCTGGCCCTGCCAGGATGAGCTGCCAAGCCTCAGGCCAGCC
 ACCTCCCACCATCCGCTGGTTGCTGAATGGGCAGCCCCTGAGCATGGTGCCCCCA
 GACCCACACCACCTCCTGCCTGATGGGACCCTTCTGCTGCTACAGCCCCCTGCCC
 GGGACATGCCACGATGGCCAGGCCCTGTCCACAGACCTGGGTGTCTACACATG
 TGAGGCCAGCAACCGGCTTGGCACGGCAGTCAGCAGAGGGCGCTCGGCTGTCTGTG
 GCTGTCTCCGGGAGGATTTCCAGATCCAGCCTCGGGACATGGTGGCTGTGGTGG
 GTGAGCAGTTTACTCTGGAATGTGGGCCGCCCTGGGGCCACCCAGAGCCCACAGT
 CTCATGGTGGAAAGATGGGAAACCCCTGGCCCTCCAGCCCGGAAGGCACACAGTG
 TCCGGGGGGTCCCTCCTGATGGCAAGAGCAGAGAAGAGTGACGAAGGGACCTACA
 TGTGTGTGGCCACCAACAGCGCAGGACATAGGGAGAGCCGCGCAGCCCCGGTTC
 CATCCAGGAGCCCCAGGACTACACGGAGCCTGTGGAGCTTCTGGCTGTGCGAATT
 CAGCTGGAAAATGTGACACTGCTGAACCCGGATCCTGCAGAGGGCCCCAAGCCTA
 GACCGGCGGTGTGGCTCAGCTGGAAGGTCAGTGGCCCTGCTGCGCCTGCCAATC
 TTACACGGCCTTGTTTCAGGACCCAGACTGCCCCGGGAGGCCAGGGAGCTCCGTGG
 GCAGAGGAGCTGCTGGCCGGCTGGCAGAGCGCAGAGCTTGGAGGCCTCCACTGGG
 GCCAAGACTACGAGTTCAAAGTGAGACCATCCTCTGGCCGGGCTCGAGGCCCTGA
 CAGCAACGTGCTGCTCCTGAGGCTGCCGGAAAAAGTGCCCAGTGCCCCACCTCAG
 GAAGTGACTCTAAAGCCTGGCAATGGCACTGTCTTTGTGAGCTGGGTCCCACCAC
 CTGCTGAAAACCACAATGGCATCATCCGTGGCTACCAGGTCTGGAGCCTGGGCAA
 CACATCACTGCCACCAGCCAACTGGACTGTAGTTGGTGAGCAGACCCAGCTGGAA
 ATCGCCACCCATATGCCAGGCTCCTACTGCGTGCAAGTGGCTGCAGTCACTGGTG
 CTGGAGCTGGGGAGCCCAGTAGACCTGTCTGCCTCCTTTTAGAGCAGGCCATGGA
 GCGAGCCACCCAAGAACCAGTGAGCATGGTCCCTGGACCCTGGAGCAGCTGAGG
 GCTACCTTGAAGCGGTAGTAAGCGGCCGC

(STOP, STOP NotI Site)

Figura 2B

MSGGDSLLGGRGSLPLLLLLLIMGGMAQDSFPQILVHPQDQLFQGPGRPARMSCQA
SGQPPPTIRWLLNGQPLSMVPPDPHLLLPDGTLLLLLQPPARGHAHDGQALSTD LG
VYTCEASNRLGTAVSRGARLSVAVLREDFQIQPRDMVAVVGEQFTLECGPPWGHP
EPTVSWWKDGKPLALQPGRHTVSGGSLLMARA EKSD EGT YMCVATNSAGHRESRA
ARVSIQEPQDYTEPV ELLAVRIQLENV TLLNPDPAEGPKPRPAVWLSWKVSGPAA
PAQSYTALFRTQTAPGGQGAPWAEELLAGWQSAELGGLHWGQDYEFKVRPSSGRA
RGPDSNVLLLLRLPEKVPSAPPQEVTLKPGNGTVFVSWVPPAENHNGIIRGYQVW
SLGNTSLPPANWTVVGEQTQLEIATHMPGSYCVQVAAVTGAGAGEPSRPVCLLLE
QAMERATQEPSEHGPWTLEQLRATLKR

Figura 3

PGPARMSCQASGQPPPTIRWLLNGQPLSMVPPDPHLLPDGTLLLLQPPARGHAH
DGQALSTD LGVYTCEASNRLGTAVSRGARLSVAVLREDFQIQPRDMVAVVGEQFT
LECGPPWGHPEPTVSWWKDGKPLALQPRHTVSGGSLLMARA EKSD EGT YMCVA

Figura 4A

PGPARMSCQASGQPPPTIRWLLNGQPLSMVPPDPHLLPDGTLLLLQPPARGHAH
DGQALSTD LGVYTCEA

Figura 4B

GEQFTLECGPPWGHPEPTVSWWKDGKPLALQPRHTVSGGSLLMARA EKSD EGT Y
MCVA

Figura 5

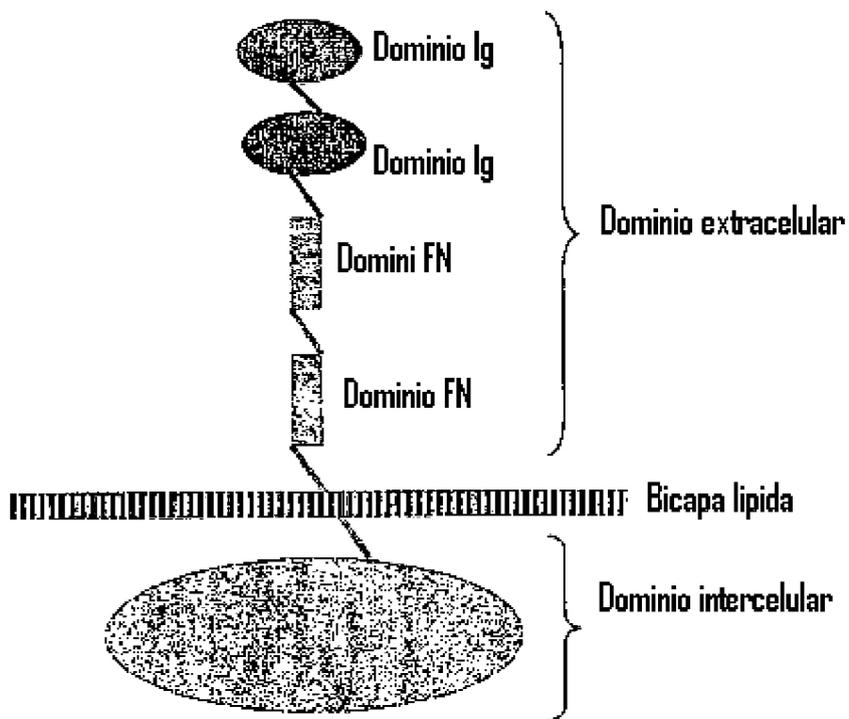


FIGURA 6A

Tratamiento	Media	Varianza
Control	2.77	0.18
100 ug/ml MR-7	1.04	0.43
100 ug/ml MR-Ecto	0.74	0.34

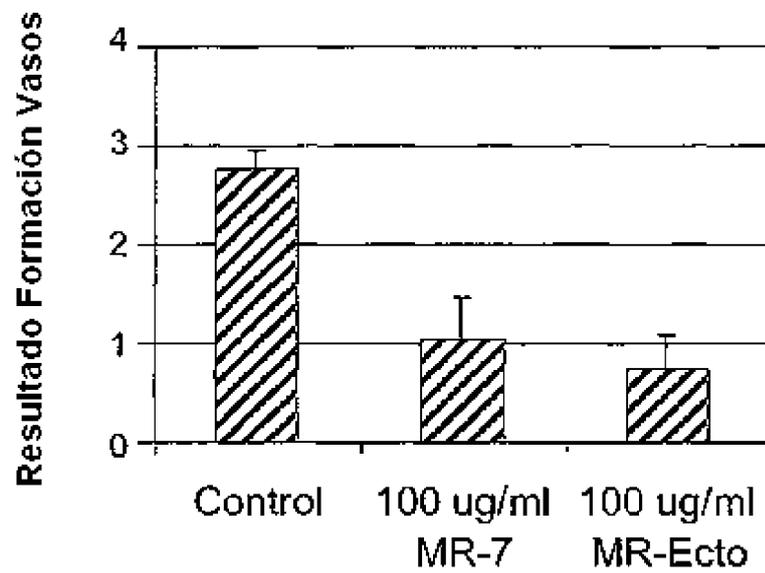


FIGURA 6B

Tratamiento	Media	Desviación Estándar
Control	2.91489	0.1579
Human IgG	3.42857	0.409303
MR ectodomain	0.632258	0.194497

BROTACIÓN ANILLO AÓRTICO

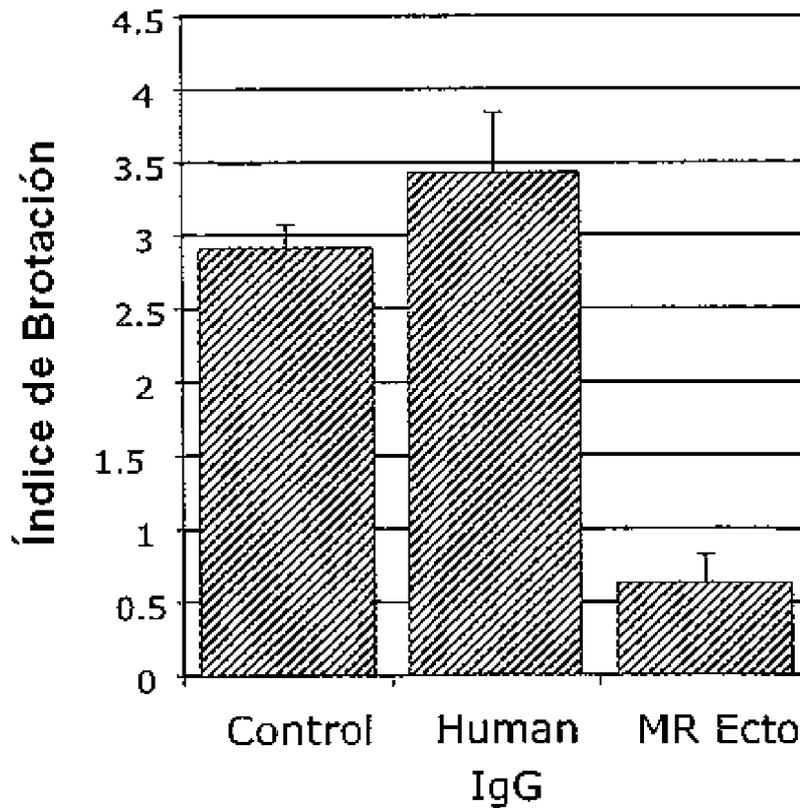
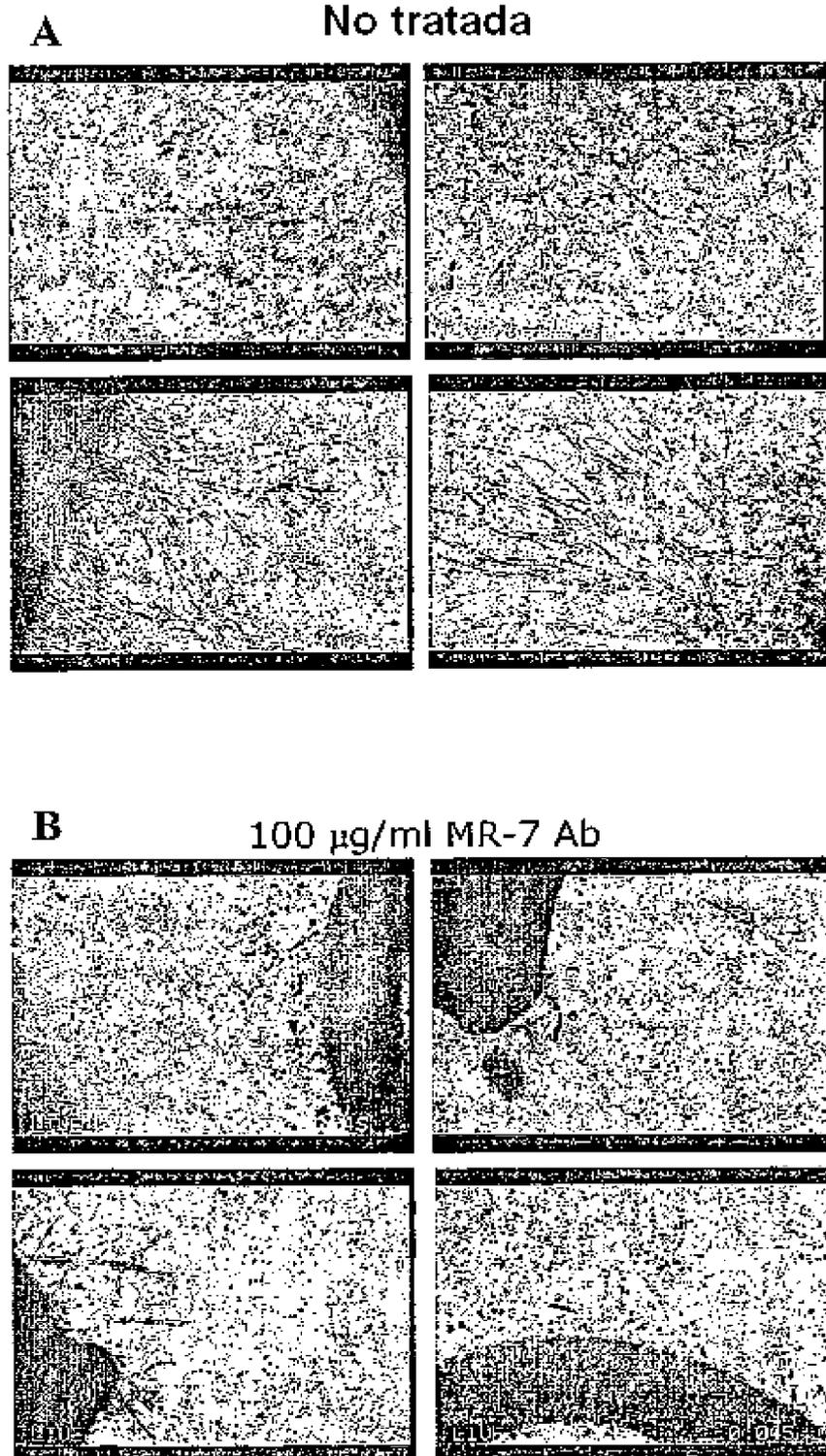


Figura 7



C 15 $\mu\text{g/ml}$ MR Ectodominio

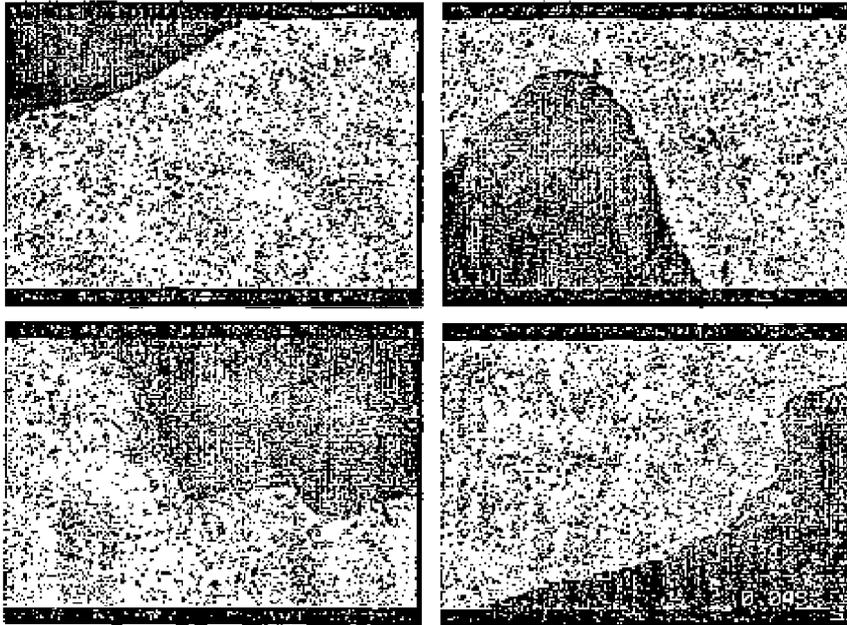


Figura 8

Grupo	Media	Desviación Estándar
bFGF	57.63	19.01
bFGF + MR ectodominio	21.5	10.89

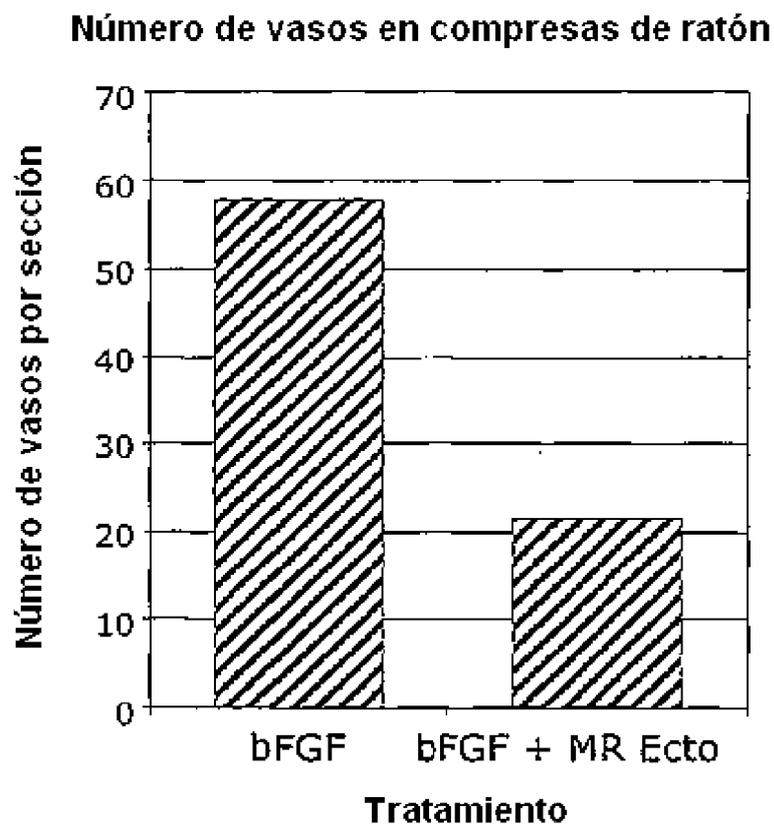


Figura 9A

Tratamiento	Media	Desviación Estándar
Control	60.5	10.41
VEGF	131.33	29.70
VEGF + MR ectodominio	21.67	4.04

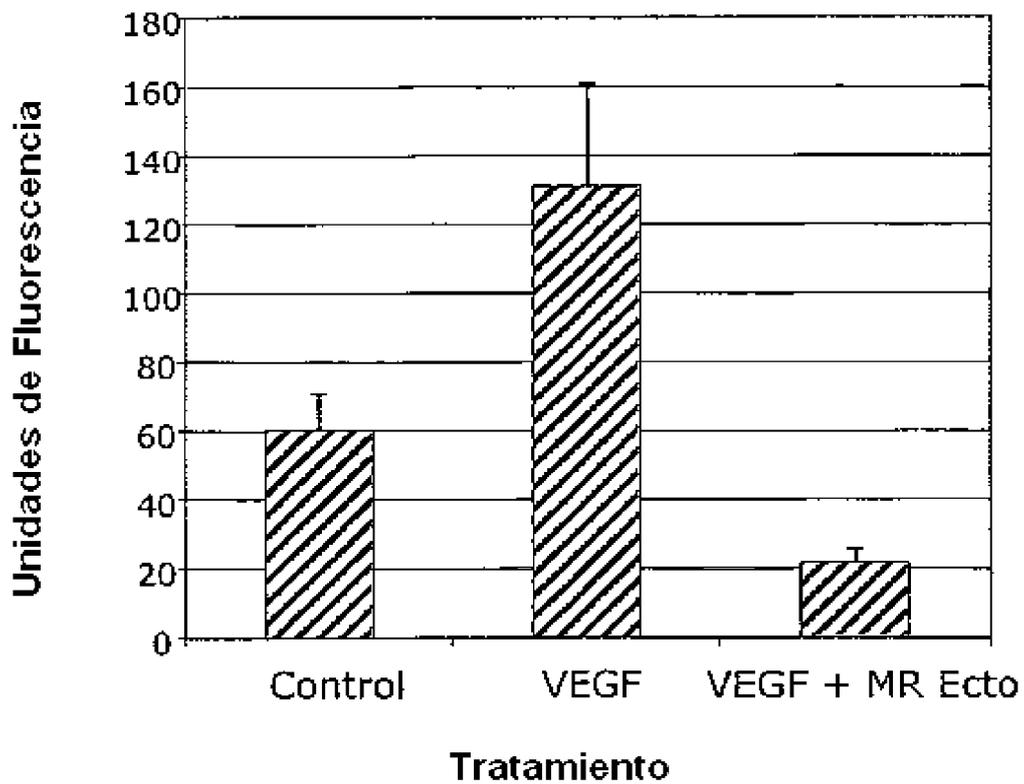


Figura 9B

Tratamiento	Media	Desviación Estándar
Control	66.33	10.41
BFGF	152.00	27.62
bFGF + MR ectodominio	21.67	1.53

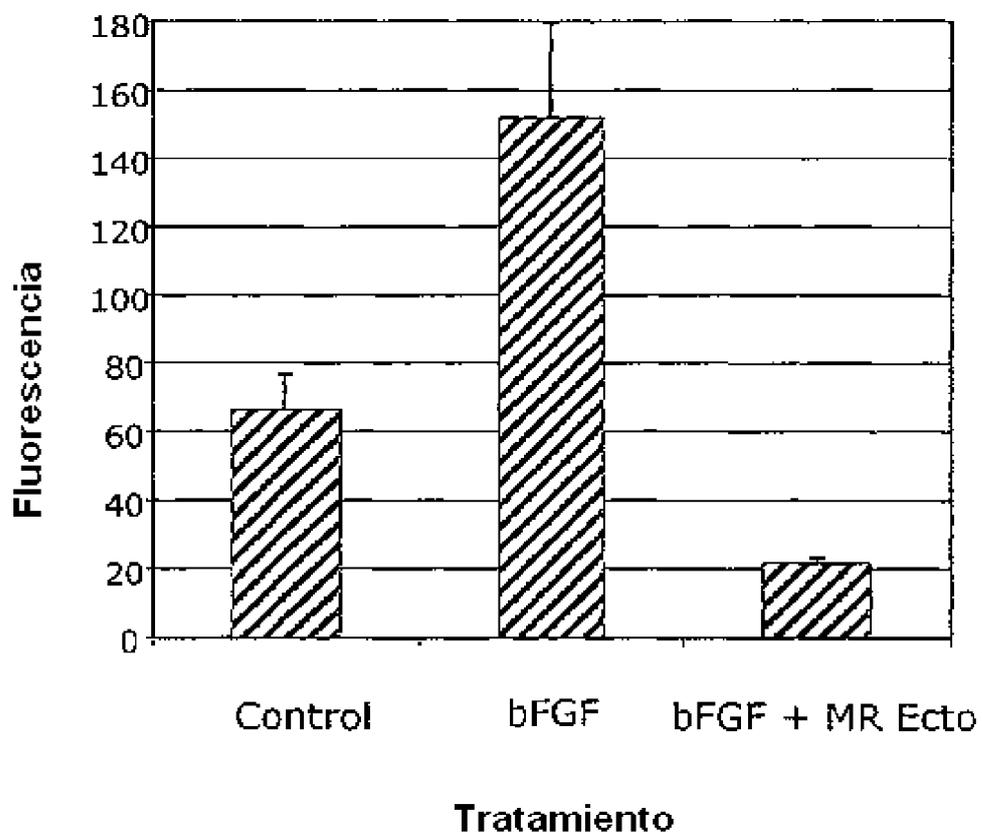


Figura 10

Tratamiento	Media de repeticiones	Desviación Estándar
Control	1957	57
100 $\mu\text{g/ml}$ Robo4-Fc	683	73
50 $\mu\text{g/ml}$ Robo4-Fc	1122	92
25 $\mu\text{g/ml}$ Robo4-Fc	1401	134
12.5 $\mu\text{g/ml}$ Robo4-Fc	1483	54
6.25 $\mu\text{g/ml}$ Robo4-Fc	1991	596
100 $\mu\text{g/ml}$ Humano IgG	2015	93

HUVEC Proliferación 4 días

