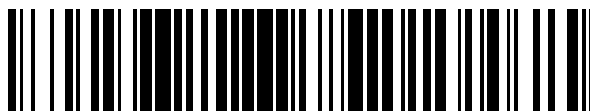


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 119**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04027975 .4**
96 Fecha de presentación: **02.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1519193**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

54 Título: **Procedimientos para tratar cánceres que expresan el factor de crecimiento endotelial vascular D**

30 Prioridad:
02.03.2000 US 186361 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
VEGENICS PTY LTD
Level 1 10 Wallace Avenue
Toorak, VIC 3142, AU

72 Inventor/es:
Achen, Marc y
Stacker, Steven

74 Agente/Representante:
Polo Flores, Carlos

ES 2 377 119 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

Procedimientos para tratar cánceres que expresan el factor de crecimiento endotelial vascular D

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La invención se refiere en general a un procedimiento de cribado de enfermedades neoplásicas seleccionadas entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer del endometrio.

Los dos componentes principales del sistema vascular de los mamíferos son las células endoteliales y las células musculares lisas. Las células endoteliales forman el recubrimiento de la superficie interna de todos los vasos sanguíneos y linfáticos del mamífero. La formación de nuevos vasos sanguíneos se puede producir mediante dos procesos diferentes, vasculogénesis y angiogénesis (véase la revisión de Risau, W., *Nature* **386**: 671-674, 1997). La vasculogénesis se caracteriza por la diferenciación *in situ* de precursores de células endoteliales a células endoteliales maduras y por la asociación de estas células para formar vasos, como ocurre en la formación del plexo vascular primario en las primeras fases del desarrollo embrionario. Por el contrario, la angiogénesis, la formación de vasos sanguíneos mediante crecimiento y ramificación de vasos preexistentes, es importante en las fases posteriores de la embriogénesis y es responsable del crecimiento de los vasos sanguíneos que se produce en el adulto. La angiogénesis es un proceso fisiológicamente complejo que supone la proliferación de las células endoteliales, la degradación de la matriz extracelular, la ramificación de los vasos y los posteriores episodios de adhesión celular. En el adulto la angiogénesis está muy controlada, y en condiciones normales está limitada al sistema reproductor femenino. Sin embargo, se puede activar la angiogénesis en respuesta a la lesión tisular. De manera importante, los tumores sólidos son capaces de inducir angiogénesis en el tejido circundante, promoviendo de esta manera el crecimiento tumoral y facilitando la formación de metástasis (Folkman J, *Nature Med.*, **1**: 27-31, 1995). Se está muy lejos de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a los complejos procesos de angiogénesis.

La angiogénesis también participa en diversas situaciones patológicas, en las que tiene una función o participa directamente en diferentes secuelas de la enfermedad. Algunos ejemplos incluyen la neovascularización que se asocia a diversas enfermedades hepáticas, las secuelas neovasculares de la diabetes, las secuelas neovasculares de la hipertensión, la neovascularización después de un traumatismo, la neovascularización debida a un traumatismo craneal, la neovascularización en las infecciones hepáticas crónicas (por ejemplo, hepatitis crónica), la neovascularización debida a un traumatismo por calor o por frío, la disfunción relacionada con el exceso de hormonas, la producción de hemangiomas y la reestenosis después de la angioplastia.

Debido a la función crucial de la angiogénesis en tantos procesos fisiológicos y patológicos, se han investigado de manera intensiva los factores que participan en el control de la angiogénesis. Se ha mostrado que varios factores de crecimiento participan en la regulación de la angiogénesis; estos incluyen los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de transformación del crecimiento alfa ($TGF\alpha$) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Véase, por ejemplo, una revisión en Folkman y col., *J. Biol. Chem.*, **267**: 10.931-10.934, 1972.

Se ha propuesto que una familia particular de factores de crecimiento específicos de células endoteliales, los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y sus correspondientes receptores, es el principal responsable de la estimulación del crecimiento y de la diferenciación de las células endoteliales, y de algunas funciones de las células diferenciadas. Estos factores son miembros de la familia PDGF/VEGF, y parecen actuar principalmente a través de las tirosina cinasas del receptor endotelial (RTK). La familia PDGF/VEGF de factores de crecimiento pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento unida a la cistina, que también incluye las neurotrofinas y el factor- β de crecimiento transformante.

Se han identificado ocho proteínas diferentes en la familia PDGF/VEGF, que son dos PDGF (A y B), VEGF y cinco miembros que están muy relacionados con VEGF. Los cinco miembros que están muy relacionados con VEGF son: VEGF-B, descrito en la Solicitud de Patente Internacional WO 96/26736 y en las Patentes de Estados Unidos 5.840.693 y 5.607.918 del Ludwig Institute for Cancer Research y la Universidad de Helsinki; VEGF-C o VEGF 2, descrito en Joukov y col., *EMBO J*, **15**: 290-298, 1996; Lee y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 1988-1992, 1996, y en las Patentes de Estados Unidos 5.932.540 y 5.935.540 de Human Genome Sciences, Inc.; VEGF-D, descrito en la Solicitud de Patente Internacional WO 98/07832 y en Achen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 548-553, 1998; el factor de crecimiento placentario (PlGF), descrito en Maglione y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 9267-9271, 1991; y VEGF3, descrito en la Solicitud de Patente Internacional WO 96/39421 por Human Genome Sciences, Inc. Cada miembro de la familia VEGF tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos entre el 30% y el 45% con VEGF. Los miembros de la familia VEGF comparten un dominio de homología con VEGF que contiene los seis residuos de cisteína del motivo de nudo de cistina. Las características funcionales de la familia VEGF incluyen grados variables de mitogenia para las células endoteliales, inducción de la permeabilidad vascular, y propiedades angiogénicas y linfangiógenicas.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una glucoproteína homodimérica que se ha aislado a partir de diferentes fuentes. La división alternativa del ARNm de un solo gen de VEGF da lugar a 5 isoformas de VEGF. VEGF muestra una actividad mitógena muy específica para las células endoteliales. VEGF tiene funciones reguladoras importantes en la formación de nuevos vasos sanguíneos en la vasculogénesis embrionaria y en la angiogénesis durante la vida adulta (Carmeliet y col. *Nature*, **380**: 435-439, 1996; Ferrara y col., *Nature*, **380**: 439-442, 1996; revisado en

- Ferrara y Davis-Smyth, *Endocrine Rev.*, **18**: 4-25, 1997). Se ha mostrado el significado de la función de VEGF en estudios que muestran que la inactivación de un solo alelo de VEGF produce la muerte del embrión debido a una alteración del desarrollo de la vasculatura (Carmeliet y col., *Nature*, **380**: 435-439, 1996; Ferrara y col., *Nature*, **380**: 439-442, 1996). Se han revisado el aislamiento y las propiedades de VEGF; véase Ferrara y col., *J. Cellular Biochem.*, **47**: 211-218, 1991 y Connolly, *J. Cellular Biochem.*, **47**: 219-223, 1991.
- Además, VEGF tiene una actividad quimioatrayente intensa hacia los monocitos, puede inducir el activador del plasminógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno en las células endoteliales, y también puede inducir la permeabilidad microvascular. Debido a esta última actividad, a veces se denomina factor de permeabilidad vascular (VPG). VEGF también es quimioatrayente para algunas células hematopoyéticas. La bibliografía reciente indica que VEGF bloquea la maduración de las células dendríticas y de esta manera reduce la eficacia de la respuesta inmunitaria a los tumores (muchos tumores secretan VEGF) (Gabrilovich y col., *Blood*, **92**: 4150-4166, 1998; Gabrilovich y col., *Clinical Cancer Research*, **5**: 2963-2970, 1999).
- VEGF-B tiene unas propiedades angiogénicas y de otro tipo similares a las de VEGF, aunque se distribuye y se expresa en los tejidos de manera diferente a VEGF. En particular, VEGF-B se expresa de manera muy intensa en el corazón, y sólo débilmente en el pulmón, mientras que ocurre lo contrario para VEGF. Esto indica que VEGF y VEGF-B, a pesar del hecho de que se coexpresan en muchos tejidos, pueden tener diferencias funcionales.
- VEGF-B se aisló usando una técnica de cribado de trampa de interacción con cohibridos en levaduras haciendo el cribado de proteínas celulares que podrían interactuar con la proteína celular de unión de ácido retinoico de tipo I (CRABP-I). Su aislamiento y sus características se describen en detalle en el documento WO 96/26736, en las Patentes de Estados Unidos 5.840.693 y 5.607.918 del Ludwig Institute for Cancer Research y la Universidad de Helsinki, y en Olofsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2576-2581, 1996.
- VEGF-C se aisló de medios acondicionados de la línea celular del adenocarcinoma de próstata PC-3 (CRL1435) mediante cribado de la capacidad del medio de producir la fosforilación de tirosina del receptor de tirosina cinasa específico de la célula endotelial VEGFR-3 (Flt4), usando células transfectadas para expresar VEGFR-3. Se purificó VEGF-C usando cromatografía de afinidad con VEGFR recombinante, y se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de PC-3. Su aislamiento y características se describen en detalle en Joukov y col. *EMBO J*, **15**: 290-298, 1996.
- VEGF-D se aisló de una biblioteca de ADNc de mama humana, disponible en el mercado en Clontech, mediante cribado con una etiqueta de secuencia expresada obtenida de una biblioteca de ADNc humano denominada "Soares Breast 3NbHBst" como sonda de hibridación (Achen y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 548-553, 1998). Su aislamiento y características se describen con detalle en la Solicitud de Patente Internacional WO 98/07832.
- En el documento WO 98/07832 también se describe el aislamiento de un fragmento biológicamente activo de VEGF-D, denominado VEGF-D Δ N Δ C. Este fragmento consiste en los residuos de aminoácidos 93 a 201 de VEGF-D unidos al péptido de la etiqueta de afinidad FLAG $\text{\textcircled{R}}$.
- El gen de VEGF-D se expresa de manera extensa en el ser humano adulto, pero evidentemente no se expresa de manera ubicua. VEGF-D se expresa de manera intensa en corazón, pulmón y músculo esquelético. Se expresan niveles intermedios de VEGF-D en bazo, ovarios, intestino delgado y colon, y hay una menor expresión en riñón, páncreas, timo, próstata y testículos. No se detectó ARNm de VEGF-D en el ARN procedente de cerebro, placenta, hígado o leucocitos de sangre periférica.
- PIGF se aisló de una biblioteca de ADNc de placenta a término. Su aislamiento y características se describen en detalle en Maglione y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 9267-9271, 1991. En la actualidad no se comprenden bien sus funciones biológicas.
- VEGF3 se aisló de una biblioteca de ADNc procedente de tejido de colon. Se ha afirmado que VEGF3 tiene una identidad de aproximadamente el 36% y una similitud del 66% con VEGF. No está claro el procedimiento de aislamiento del gen que codifica VEGF3, y no se ha descrito ninguna caracterización de su actividad biológica.
- La similitud entre dos proteínas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y las sustituciones conservadas de aminoácidos de una de las proteínas respecto a la secuencia de la segunda proteína, mientras que la identidad se determina sin incluir las sustituciones de aminoácidos conservados.
- Una función importante del sistema linfático es proporcionar el retorno de los líquidos desde los tejidos y transportar muchas sustancias extravasculares de nuevo hacia la sangre. Además, durante el proceso de maduración los linfocitos abandonan la sangre, migran a través de los órganos linfáticos y de otros tejidos, y entran en los vasos linfáticos, y vuelven a la sangre a través del conducto torácico. Unas vénulas especializadas, las vénulas endoteliales altas (VEA), se unen de nuevo a los linfocitos y producen su extravasación hacia los tejidos. De esta manera los vasos linfáticos, y especialmente los ganglios linfáticos, tienen una función importante en la inmunología y en el desarrollo de la metástasis de diferentes tumores. Al contrario que los vasos sanguíneos, no está tan claro el origen embrionario del sistema linfático y hay al menos tres teorías diferentes sobre su origen. Es difícil identificar los vasos linfáticos debido a la ausencia de marcadores específicos conocidos disponibles de los mismos.

Los vasos linfáticos se estudian habitualmente con ayuda de linfografía. En la linfografía se inyecta un medio de contraste radiológico directamente en un vaso linfático. El medio de contraste se distribuye a lo largo de los vasos de drenaje eferente del sistema linfático y se recoge en los ganglios linfáticos. El medio de contraste puede permanecer hasta medio año en los ganglios linfáticos, y durante este período el análisis radiológico permite el seguimiento del tamaño y de la arquitectura de los ganglios linfáticos. Este diagnóstico es especialmente importante en pacientes de cáncer con metástasis en los ganglios linfáticos y en las neoplasias linfáticas, como linfoma. Sin embargo, en la técnica son necesarios materiales y procedimientos mejorados para el diagnóstico por imagen de los tejidos linfáticos.

Como se ha observado anteriormente, los miembros de la familia PDGF/VEGF actúan principalmente uniéndose a las tirosina cinasas del receptor. En general las tirosina cinasas del receptor son glucoproteínas que consisten en un dominio extracelular capaz de unirse a un factor de crecimiento específico, un dominio transmembrana que normalmente es la porción alfa-helicoidal de la proteína, un dominio yuxtamembrana, que es donde el receptor puede regularse mediante, por ejemplo, fosforilación de proteínas, un dominio tirosina cinasa, que es el componente enzimático del receptor y una etiqueta carboxiterminal, que en muchos receptores participa en el reconocimiento y en la unión de los sustratos de la tirosina cinasa.

Se han identificado cinco tirosina cinasas del receptor específicas de células endoteliales, concretamente, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4), Tie y Tek/Tie-2. Estos receptores difieren en su especificidad y afinidad. Todos ellos tienen la actividad tirosina cinasa intrínseca que es necesaria para la transducción de señales.

Las únicas tirosina cinasas del receptor que se sabe que se unen a los VEGF son VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. VEGFR-1 y VEGFR-2 se unen a VEGF con una elevada afinidad, y VEGFR-1 también se une a VEGF-B y a P1GF. También se ha mostrado que VEGF-C es un ligando de VEGFR-3, y también activa a VEGFR-2. (Joukov y col., *EMBO J*, **15**: 290-298, 1996). VEGF-D se une tanto a VEGFR-2 como VEGFR-3 (Achen y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 548-553, 1998). Se ha descrito un ligando de Tek/Tie-2 en la Solicitud de Patente Internacional Nº PCT/US95/12935 (WO 96/11269) de Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Todavía no se ha identificado el ligando de Tie.

Recientemente se ha purificado y clonado un nuevo receptor específico de la isoforma de VEGF de 130-135 kD (Soker y col., *Cell*, **92**: 735-745, 1998). Se descubrió que el receptor de VEGF se une específicamente a la isoforma VEGF₁₆₅ mediante la secuencia codificada por el exón 7, que muestra una débil afinidad por heparina (Soker y col., *Cell*, **92**: 735-745, 1998). Sorprendentemente, se mostró que el receptor era idéntico a la neuropilina humana 1 (NP-1), un receptor que participa en la neuromorfogénesis de las primeras etapas. PlGF-2 también parece interactuar con NP-1 (Migdal y col. *J. Biol. Chem.*, **273**: 22272-22278, 1998).

VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 se expresan de manera diferente en las células endoteliales. En general, en el endotelio de los vasos sanguíneos se expresa tanto VEGFR-1 como VEGFR-2 (Oelrichs y col., *Oncogene*, **8**: 11-18, 1992; Kaipainen y col., *J. Exp. Med.*, **178**: 2077-2088, 1993; Dumont y col., *Dev. Dyn.*, **203**: 80-92, 1995; Fong y col., *Dev. Dyn.*, **207**: 1-10, 1996), y VEGFR-3 se expresa principalmente en el endotelio linfático de los tejidos adultos (Kaipainen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **9**: 3566-3570, 1995). VEGFR-3 también se expresa en la vasculatura sanguínea que rodea los tumores.

Aunque VEGFR-1 se expresa principalmente en las células endoteliales durante el desarrollo, también se puede encontrar en las células precursoras hematopoyéticas durante las etapas tempranas de la embriogénesis (Fong y col., *Nature*, **376**: 66-70, 1995). En los adultos los monocitos y los macrófagos también expresan este receptor (Barleon y col., *Blood*, **87**: 3336-3343, 1995). En los embriones, la mayor parte de los vasos, por no decir todos, expresan VEGFR-1 (Braier y col., *Dev. Dyn.*, **204**: 228-239, 1995; Fong y col., *Dev. Dyn.*, **207**: 1-10, 1996).

El receptor VEGFR-3 se expresa de manera extensa en las células endoteliales durante las fases tempranas del desarrollo embrionario, pero a medida que progresa la embriogénesis queda restringido al endotelio venoso y posteriormente al endotelio linfático (Kaipainen y col., *Cancer Res.*, **54**: 6571-6577, 1994; Kaipainen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3566-3570, 1995). VEGFR-3 se expresa en las células endoteliales linfáticas de los tejidos adultos. Este receptor es esencial para el desarrollo vascular durante la embriogénesis.

Se ha demostrado la función esencial y específica en la vasculogénesis, angiogénesis y/o linfangiogénesis de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Tie y Tek/Tie-2 mediante mutaciones dirigidas que inactivan estos receptores en embriones de ratón. La alteración de los genes de VEGFR produce el desarrollo aberrante de la vasculatura, lo que da lugar a la muerte del embrión hacia la mitad de la gestación. El análisis de los embriones que son portadores de un gen VEGFR-1 completamente inactivado indica que este receptor es necesario para la organización funcional del endotelio (Fong y col., *Nature*, **376**: 66-70, 1995). Sin embargo, la delección del dominio tirosina cinasa intercelular de VEGFR-1 genera ratones viables con una vasculatura normal (Hiratsuka y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 9349-9354, 1998). Aún se deben explicar las razones subyacentes a estas diferencias, aunque indican que no es necesaria la señalización del receptor a través de la tirosina cinasa para la función adecuada de VEGFR-1. El análisis de ratones homocigotos con alelos inactivados de VEGFR-2 indica que este receptor es necesario para la proliferación de las células endoteliales, hematopoyesis y vasculogénesis (Shalaby y col., *Nature*, **376**: 62-66, 1995; Shalaby y col., *Cell*, **89**: 981-990, 1997). La inactivación dirigida de las dos copias del gen VEGFR-3 en ratones da lugar a la formación de vasos sanguíneos defectuosos que se caracterizan por unos vasos organizados grandes con organización anómala y con lúmenes defectuosos, lo que da lugar a acumulación de líquido en la cavidad pericárdica y a insuficiencia cardiovascular el día 9,5

después del coito (Dumont y col., *Science*, **282**: 946-949, 1998). De acuerdo con estos hallazgos se ha propuesto que es necesario VEGFR-3 para la maduración de las redes vasculares primarias para que se conviertan en vasos sanguíneos de mayor tamaño. Sin embargo, no se pudo estudiar en estos ratones la función de VEGFR-3 en el desarrollo de la vasculatura linfática porque los embriones murieron antes de que apareciera el sistema linfático. Sin embargo, se asume que VEGFR-3 tiene una función en el desarrollo de la vasculatura linfática y de la linfangiogénesis dada su expresión específica en las células endoteliales linfáticas durante la embriogénesis y la vida adulta. Esto está apoyado por el hallazgo de que la expresión ectópica de VEGF-C, un ligando de VEGFR-3, en la piel de ratones transgénicos de lugar a la proliferación de las células endoteliales linfáticas y al aumento del tamaño vascular en ratones. Además, esto indica que VEGF-C puede tener una función primaria en el endotelio linfático y una función secundaria en la angiogénesis y en la regulación de la permeabilidad, que comparte con VEGF (Joukov y col., *EMBO J*, **15**: 290-298, 1996).

Además, se han identificado proteínas similares a VEGF que son codificadas por cuatro cepas diferentes del virus orf. Ésta es la primera vez que se ha descrito que un virus codifica una proteína parecida a VEGF. Las dos primeras cepas son NZ2 y NZ7 y se describen en Lytle, *J. Virol.*, **68**: 84-92, 1994. Una tercera es D1701 y está descrita en Meyer y col., *EMBO J*, **18**: 363-374, 1999. La cuarta cepa es NZ10, y se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US99/25869. Se mostró que estas proteínas víricas parecidas a VEGF se unen al VEGFR-2 del endotelio del huésped (oveja/cabra/ser humano), y que esta unión es importante para el desarrollo de la infección (Meyer y col., *EMBO J*, **18**: 363-374, 1999; Ogawa y col., *J. Biol. Chem.*, **273**: 31273-31,282, 1998; y Solicitud de Patente Internacional PCT/US99/25869). Estas proteínas muestran similitud de la secuencia de aminoácidos con VEGF y entre sí.

El virus ORF es un tipo de especie del género parapoxvirus que produce una dermatitis pustulosa muy contagiosa en ovejas y en cabras y que se transmite fácilmente a los seres humanos. La dermatitis pustulosa inducida por el virus orf se caracteriza por dilatación de los vasos sanguíneos, tumefacción del área local y una marcada proliferación de las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos. Estas características se observan en todas las especies infectadas por el virus orf y pueden dar lugar a la formación de un crecimiento pseudotumoral o a un nódulo debido a la replicación del virus en las células de la epidermis. Generalmente, las infecciones por el virus orf se resuelven en unas pocas semanas, aunque se ven infecciones graves que no se resuelven sin intervención quirúrgica en personas que tienen una alteración de la inmunidad.

Hay un gran interés en el desarrollo de agentes farmacológicos que puedan antagonizar las acciones mediadas por el receptor de los VEGF (Martiny-Baron y Marme, *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 675-680, 1995). Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales frente a VEGF suprimen el crecimiento tumoral *in vivo* inhibiendo la angiogénesis asociada al tumor (Kim y col., *Nature*, **362**: 841-844, 1993). Se han observado efectos inhibidores similares sobre el crecimiento tumoral en sistemas modelo que se originan por la expresión de ARN no codificante de VEGF (Saleh y col., *Cancer Res.*, **56**: 393-401, 1996) o un mutante dominante-negativo de VEGFR-2 (Millauer y col., *Nature*, **367**: 576-579, 1994).

Sin embargo, los estudios de inhibición de tumor con anticuerpos neutralizantes indicaron que pueden participar otros factores angiogénicos además de VEGF (Kim y col., *Nature*, **362**: 841-844, 1993). Además, la actividad de factores angiogénicos diferentes a VEGF en el melanoma maligno viene indicada por el hallazgo de que no todos los melanomas expresan VEGF (Issa, R. y col., *Lab. Invest.*, **79**: 417-425, 1999).

Actualmente se están aclarando las funciones biológicas de los diferentes miembros de la familia VEGF. Tienen particular interés las propiedades de VEGF-D y de VEGF-C. Estas proteínas se unen tanto a VEGFR-2 como a VEGFR-3, que están localizados en las células endoteliales vasculares y linfáticas, respectivamente, y están relacionadas entre sí en su estructura primaria (identidad de aminoácidos del 48%). Ambos factores son mitógenos para las células endoteliales *in vitro*. Recientemente se ha mostrado que VEGF-C es angiogénico en el modelo de córnea de ratón y en la membrana corioalantoidea aviar (Cao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 14389-14394, 1998), y puede inducir la angiogénesis en el contexto de la isquemia tisular (Witzenbichler y col., *Am. J. Pathol.*, **153**: 381-394, 1998). Además, VEGF-C estimula la linfangiogénesis en la membrana corioalantoidea aviar (Oh y col., *Dev. Biol.*, **188**: 96-109, 1997) y en un modelo de ratón transgénico (Jeltsch y col., *Science*, **276**: 1423-1425, 1997). Se mostró que VEGF-D era angiogénico en la córnea de conejo (Marconcini y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 9671-9676, 1999). Todavía no se ha descrito la capacidad linfangiogénica de VEGF-D; sin embargo, puesto que VEGF-D, al igual que VEGF-C, se une a VEGFR-3, que es un receptor que se piensa que actúa en la señalización de la linfangiogénesis (Taipale y col., *Curr. Topics Micro. Immunol.*, **237**: 85-96, 1999) y lo activa, es muy probable que VEGF-D sea linfangiogénico. VEGF-D y VEGF-C pueden tener una importancia particular en la malignidad de los tumores, puesto que las metástasis se pueden diseminar a través de los vasos sanguíneos o de los vasos linfáticos; por lo tanto, las moléculas que estimulan la angiogénesis o la linfangiogénesis podrían contribuir a la formación de neoplasias malignas. Ya se ha mostrado que esto ocurre así en el caso de VEGF. Se debe señalar que la expresión del gen de VEGF-D es inducida por c-Fos, un factor de transcripción que se sabe que es importante para el desarrollo de neoplasias (Orlandini y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11675-11680, 1996). Se especula que el mecanismo mediante el cual c-Fos contribuye a la formación de neoplasias es la activación de genes que codifican factores angiogénicos. Las células tumorales deficitarias en c-Fos no experimentan progresión maligna, probablemente debido a la incapacidad de inducir la angiogénesis (Saez y col., *Cell*, **82**: 721-732, 1995). Esto indica la existencia de un factor angiogénico aumentado por c-Fos durante la progresión tumoral.

Como se muestra en la Figura 1, la forma intracelular predominante de VEGF-D es un propéptido homodimérico que consiste en el dominio de homología de VEGF-PDFG (VHD) y los propéptidos N- y C-terminales, y tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2. Después de su secreción este polipéptido se escinde proteolíticamente (Stacker, S.A., y col., *J. Biol.*

Chem., **274**: 32127-32136, 1999). El procesado proteolítico (en las posiciones que se señalan con cabezas de flecha negras) da lugar a formas parcialmente procesadas y a una forma madura y totalmente procesada que consiste en dímeros de VHD. El VHD, que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 (es decir, residuos 93 a 201 del VEGF-D de longitud completa), contiene sitios de unión tanto para VEGFR-2 como para VEGFR-3. La forma madura se une tanto a VEGFR-2 como a VEGFR-3 con una afinidad mucho mayor que la forma no procesada (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32.127-32.136, 1999).

No se ha estudiado la localización de la proteína VEGF-D en los cánceres humanos debido a la ausencia de anticuerpos específicos frente a VHD o frente a VEGF-D. Los anticuerpos frente a los propéptidos N- y C-terminales son inadecuados porque estas regiones se escinden del VHD bioactivo y se localizarían en un lugar diferente al VHD (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999).

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento para cribar una enfermedad neoplásica seleccionada entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata y cáncer de endometrio, que comprende:

i) exponer una muestra de tejido obtenida de un organismo del que se sospecha que está en dicho estado de enfermedad neoplásica a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio de homología de VEGF de VEGF-D;

ii) lavar dicha muestra de tejido; y

iii) cribar dicha enfermedad detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho anticuerpo monoclonal en dicha muestra de tejido, en la que la detección de VEGF-D en o sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos o las células endoteliales linfáticas en o alrededor de un crecimiento neoplásico potencial indica la enfermedad neoplásica.

RESUMEN DE LA INVENCION

La descripción se refiere en general a un procedimiento para tratar y aliviar melanomas y diversos cánceres, procedimientos para cribar enfermedades neoplásicas, y un procedimiento para mantener la vascularización del tejido normal.

En este documento se describe un procedimiento para tratar un organismo que padece una enfermedad neoplásica que se caracteriza por la expresión de VEGF-D por un tumor seleccionado entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, tumores de próstata y cáncer de endometrio. El procedimiento comprende cribar un organismo para determinar la presencia o ausencia de células tumorales que expresen VEGF-D; seleccionar el organismo determinado del cribado para tenga un tumor que exprese VEGF-D; y administrar una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-D en la proximidad de dicho tumor para evitar la unión de VEGF-D a su receptor correspondiente.

Los antagonistas de VEGF-D pueden inhibir la expresión de VEGF-D, tal como con el uso de una composición que comprende un ácido nucleico no codificante o ADN de triple hebra que codifica VEGF-D.

Los antagonistas de VEGF-D también pueden inhibir la actividad de VEGF-D, tal como con el uso de compuestos que comprenden anticuerpos y/o inhibidores competitivos o no competitivos de la unión de VEGF-D tanto en la formación de dímeros como en la unión al receptor. Estos antagonistas de VEGF-D incluyen un polipéptido modificado de VEGF-D, como se describe más adelante, que tiene la capacidad de unirse a VEGF-D e impedir su unión a los receptores de VEGF-D, o que tiene la capacidad de unirse a los receptores de VEGF-D, pero que no puede estimular la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de las células endoteliales. También se pueden usar pequeñas moléculas que inhiben VEGF-D, VEGFR-2 o VEGFR-3 y anticuerpos dirigidos frente a VEGF-D, VEGFR-2 o VEGFR-3.

Se contempla que algunos polipéptidos modificados de VEGF-D tendrán la capacidad de unirse a los receptores de VEGF-D de las células que incluyen, pero sin limitación, células endoteliales, células del tejido conectivo, miofibroblastos y/o células mesenquimatosas, pero que serán incapaces de estimular la proliferación, diferenciación, migración, motilidad o supervivencia celular o de inducir proliferación vascular, formación del tejido conectivo o curación de las heridas. Se espera que estos polipéptidos modificados puedan actuar como inhibidores competitivos o no competitivos de los polipéptidos VEGF-D y de los factores de crecimiento de la familia PDGF/VEGF, y que sean útiles en situaciones en las que es deseable la prevención o la reducción de la acción del polipéptido VEGF-D o de los factores de crecimiento de la familia PDGF/VEGF. Así, estas variantes del polipéptido VEGF-D que se unen al receptor pero que no son mitógenos, no inducen a diferenciación, no inducen la migración, no inducen la motilidad, no promueven la supervivencia, no promueven la formación de tejido conectivo, no inducen la curación de las heridas y no inducen la proliferación vascular también se describen, y se denominan en este documento "variante de unión al receptor pero por lo demás inactiva". Como VEGF-D forma un dímero para activar sus receptores, se contempla que un monómero comprende la "variante de unión al receptor pero por lo demás inactiva" del polipéptido VEGF-D que se ha mencionado anteriormente y un segundo monómero comprende un VEGF-D de tipo natural o un factor de crecimiento de tipo natural de la familia PDGF/VEGF. Así, estos dímeros se pueden unir a su correspondiente receptor pero no pueden inducir la señalización en la dirección 3'.

También se contempla que hay otros polipéptidos VEGF-D modificados que pueden impedir la unión de un polipéptido VEGF-D de tipo natural o un factor de crecimiento de tipo natural de la familia PDFG/VEGF a su correspondiente receptor en las células que incluyen, pero sin limitación, células endoteliales, células del tejido conectivo (tales como fibroblastos), miofibroblastos y/o células mesenquimatosas. Así, estos dímeros serán incapaces de estimular la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de las células endoteliales y de inducir la permeabilidad vascular, y/o de estimular la proliferación y/o la diferenciación y/o la motilidad de las células del tejido conectivo, de los miofibroblastos o de las células mesenquimatosas. Se espera que estos polipéptidos modificados puedan actuar como inhibidores competitivos o no competitivos de VEGF-D o de un factor de crecimiento de la familia PDFG/VEGF, y que sean útiles en situaciones en las que es deseable la prevención o la reducción de la acción de VEGF-D o de un factor de crecimiento de la familia PDFG/VEGF. Dichas situaciones incluyen el remodelado tisular que tiene lugar durante la invasión de las células tumorales en una población celular mediante formación de un tumor primario o metastásico. Así, dichas variantes de factor de crecimiento VEGF-D que se unen al factor de crecimiento VEGF-D o a un factor de crecimiento de la familia PDFG/VEGF pero que no son mitógenos, no inducen a diferenciación, no inducen la migración, no inducen la movilidad, no promueven la supervivencia, no promueven el tejido conectivo, no inducen la curación de las heridas y no inducen la proliferación vascular también se describen, y en este documento se denominan "variantes formadoras del dímero del factor de crecimiento VEGF-D pero por lo demás inactivas o que producen interferencia".

Las posibles formas modificadas del polipéptido VEGF-D se pueden preparar dianizando regiones esenciales del polipéptido VEGF-D para su modificación. Se espera que estas regiones esenciales estén dentro del dominio de homología de PDFG/VEGF altamente conservado (VHD). En particular, los factores de crecimiento de la familia PDFG/VEGF, incluyendo VEGF, son dimericos, y VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDFG-A y PDFG-B muestran la conservación completa de ocho residuos de cisteína en el VHD (Olofsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2576-2581, 1996; Joukov y col., *EMBO J*, **15**: 290-298, 1996). Se piensa que estas cisteínas participan en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares. Además, hay más residuos de cisteína muy conservados, aunque no completamente, en los dominios C-terminales. Los bucles 1, 2 y 3 de cada subunidad VHD, que se forman mediante la formación de enlaces disulfuro intramoleculares, participan en la unión a los receptores de los factores de crecimiento de la familia PDFG/VEGF (Andersson y col., *Growth Factors*, **12**: 159-164, 1995). Se puede estudiar fácilmente la capacidad de los polipéptidos modificados de inhibir la actividad biológica de VEGF-D mediante procedimientos rutinarios de ensayos de la actividad como el ensayo de proliferación de las células endoteliales.

Los antagonistas de VEGF-D de la descripción también pueden incluir moléculas que comprenden polipéptidos que corresponden a los dominios de unión a VEGF-D de VEGFR-2 (Flk1) o de VEGFR-3 (Flt4). Por ejemplo, las proteínas de fusión a IgG solubles que describen Achen y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 548-553, 1998, que contienen los dominios extracelulares del VEGFR-2 humano y de VEGFR-3 humano y que se unen a VEGF-D Δ N Δ C se podrían usar de manera adecuada como antagonistas de VEGF-D.

El procedimiento para tratar o aliviar los melanomas y diversos cánceres también puede producirse dianizando un tumor que expresa VEGF-D, VEGFR-2 y/o VEGFR-3 para conseguir su muerte. Esto supondría el acoplamiento de un agente citotóxico a un polipéptido de la descripción, un anticuerpo dirigido frente a VEGF-D, VEGFR-2 VEGFR-3 o una pequeña molécula dirigida frente a VEGF-D, VEGFR-2 o VEGFR-3, a fin de matar un tumor que expresa VEGF-D, VEGFR-2 y/o VEGFR-3. Dichos agentes citotóxicos incluyen, aunque sin limitación, toxinas de plantas (por ejemplo, cadena A de ricina, saporina), toxinas bacterianas o fúngicas (por ejemplo, toxina diftérica) o radionucleótidos (por ejemplo, astatina 211, bismuto 212, itrio 90, yodo 131, tecnecio 99), agentes alquilantes (por ejemplo, clorambucil), agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca) y agentes que producen intercalación del ADN (por ejemplo, adriamicina).

Los polipéptidos, antagonistas de VEGF-D o anticuerpos que inhiben la actividad biológica de VEGF-D también se pueden emplear en combinación con una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un vehículo o un adyuvante sólido o líquido farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica preferida inhibirá una actividad biológica inducida por al menos VEGF-D o interferirá con la misma.

Los ejemplos de un vehículo o un adyuvante de este tipo incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, solución de Ringer, aceite mineral, talco, almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico, ácido alginoico, dextrosa, agua, glicerol, etanol, espesantes, estabilizantes, agentes dispersantes y combinaciones de los mismos. Dichas composiciones pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, cremas, pomadas, elixires, jarabes, obleas, ungüentos u otras formas convencionales. Por supuesto, se puede ajustar la formulación según principios conocidos para adecuarse al modo de administración. Las composiciones que comprenden un péptido de la invención contendrán desde aproximadamente el 0,1% al 90% en peso del compuesto activo, y más generalmente desde aproximadamente el 10% al 30%.

La dosis y la vía de administración dependerán de la naturaleza del paciente y de la afección que se va a tratar, y estarán a la discreción del médico o veterinario responsable. Las vías adecuadas incluyen oral, inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, administración parenteral, aplicación tópica, implantes, etc. Por ejemplo, se administra una cantidad eficaz de un péptido o anticuerpo de la invención a un organismo que necesita el mismo en una dosis entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente entre 1 y 10 mg/kg de peso corporal. Para los anticuerpos humanizados, que típicamente muestran una semivida circulante larga, se contempla específicamente la administración a intervalos que van desde una vez al día a una vez al mes, y más preferentemente una vez a la semana

o una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. La monitorización de la progresión del tratamiento, de los efectos adversos del paciente y de las concentraciones de anticuerpos circulantes proporcionará una guía adicional del régimen posológico óptimo. Los datos de ensayos clínicos publicados y en realización para otros tratamientos antineoplásicos basados en anticuerpos (por ejemplo, anti-HER-2, receptor anti-EGF) también proporcionan una guía sobre el régimen posológico útil. La aplicación tópica de VEGF-D puede ser usada de manera análoga a VEGF.

También se describe en este documento un procedimiento para cribar una enfermedad neoplásica seleccionada entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer de endometrio, caracterizado por un aumento en las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos en o alrededor de un crecimiento neoplásico. El procedimiento comprende obtener una muestra de un organismo del que se sospecha que esté en un estado de enfermedad neoplásica caracterizado por un aumento de las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos en o alrededor de un crecimiento neoplásico; exponer dicha muestra a una composición que comprende un compuesto que se une específicamente a VEGF-D; lavar dicha muestra; y cribar dicha enfermedad detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho compuesto en dicha muestra, en la que la detección de VEGF-D en o sobre las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos en y alrededor de un crecimiento neoplásico potencial es indicativo de una enfermedad neoplásica. Este procedimiento puede comprender adicionalmente exponer la muestra a un segundo compuesto que se une específicamente a VEGFR-2 y/o a VEGFR-3, y en el que la etapa de cribado comprende la detección del compuesto que se une a VEGF-D y el segundo compuesto unido a las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos, para determinar la presencia, cantidad o distribución de las células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos que tienen tanto VEGF-D como VEGFR-2 y/o VEGFR-3 en y alrededor de un crecimiento neoplásico potencial.

Claramente se podrá comprender que para los objetivos de esta memoria descriptiva el término "muestra" incluye, pero sin limitación, obtener una muestra tisular, sangre, suero, plasma, orina, líquido de ascitis o efusión pleural. Preferiblemente, el tejido es un tejido humano y el compuesto es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Se apreciará que el uso del segundo compuesto ayuda al especialista a confirmar que el VEGF-D hallado en los vasos en o cerca del tumor, surge debido a la captación mediada por el receptor, lo que sustenta la hipótesis de que VEGF-D, secretado por las células tumorales, se une y se acumula en las células endoteliales diana, estableciendo de esta manera un mecanismo paracrino que regula la angiogénesis tumoral.

También se describe en este documento un procedimiento para cribar una enfermedad neoplásica seleccionada entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer del endometrio, caracterizado por un aumento de la expresión de VEGF-D. El procedimiento comprende obtener una muestra de un organismo del que se sospecha que está en un estado de la enfermedad, caracterizado por un aumento de la expresión de VEGF-D; exponer dicha muestra a una composición que comprende un compuesto que se une específicamente a VEGF-D; lavar dicha muestra; y cribar dicha enfermedad detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho compuesto en dicha muestra, en la que la detección de VEGF-D en las células en y alrededor de un crecimiento neoplásico potencial es indicativo de una enfermedad neoplásica o de VEGF-D en o sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos en y alrededor de un crecimiento neoplásico potencial es indicativo de una enfermedad neoplásica.

También se describe en este documento un procedimiento para cribar una enfermedad neoplásica seleccionada entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer del endometrio, caracterizado por un cambio en las células endoteliales de los vasos linfáticos. El procedimiento comprende obtener una muestra de un organismo del que se sospecha que está en un estado de enfermedad caracterizado por un aumento en las células endoteliales de los vasos linfáticos; exponer dicha muestra a una composición que comprende un compuesto que se une específicamente a VEGF-D; lavar dicha muestra; y cribar dicha enfermedad detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho compuesto en dicha muestra tisular, en la que la detección de VEGF-D sobre o en las células endoteliales linfáticas en y alrededor de un crecimiento neoplásico potencial es indicativo de una enfermedad neoplásica. Este procedimiento puede comprender adicionalmente exponer la muestra tisular a un segundo compuesto que se une específicamente a VEGFR-3, y en el que la etapa de cribado comprende la detección del compuesto que se une a VEGF-D y el segundo compuesto unido a las células endoteliales de los vasos linfáticos, para determinar la presencia, cantidad o distribución de las células endoteliales de los vasos linfáticos que tienen tanto VEGF-D como VEGFR-3 en y alrededor de un crecimiento neoplásico potencial.

Se apreciará que el uso del segundo compuesto ayuda a confirmar que el VEGF-D hallado en los vasos linfáticos en o cerca del tumor surge debido a la captación mediada por el receptor, lo que sustenta la hipótesis de que el VEGF-D, secretado por las células tumorales, se une y se acumula en las células endoteliales linfáticas diana estableciendo de esta manera un mecanismo paracrino que regula la linfangiogénesis tumoral.

También se describe en este documento un procedimiento para mantener la vascularización del tejido en un organismo, que comprende administrar a dicho organismo que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de VEGF-D, o un fragmento o análogo del mismo que tiene la actividad biológica de VEGF-D.

Se contempla que esta descripción es importante cuando VEGF-D/VEGF son limitantes en los tejidos de pacientes, especialmente en los pacientes de mayor edad en los que los vasos periféricos pueden estar en un estado de atrofia. El tratamiento con una cantidad eficaz de VEGF-D puede ayudar a mantener la integridad de la vasculatura

al estimular la proliferación de las células endoteliales en los vasos envejecidos/dañados.

Preferiblemente, el VEGF-D se expresa como VEGF-D sin procesar de longitud completa o como la forma madura completamente procesada de VEGF-D, así como fragmentos o análogos de tanto la forma de longitud completa como madura de VEGF-D que tienen la actividad biológica de VEGF-D como se define en este documento.

- 5 Claramente se podrá comprender que para los objetivos de esta memoria descriptiva la frase "VEGF-D totalmente procesado" se refiere a la forma madura del polipéptido VEGF-D, es decir, el dominio de homología de VEGF (VHD), que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3, que carece de los propéptidos N- y C-terminales. La frase "forma procesada proteolíticamente de VEGF-D" se refiere a un polipéptido VEGF-D que carece del propéptido N- y/o C-terminal, y la frase "VEGF-D no procesado" se refiere a un polipéptido VEGF-D de longitud completa que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2 y
- 10 que tiene los propéptidos N- y C-terminales.

- El polipéptido VEGF-D de longitud completa que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2 puede estar opcionalmente unido al péptido FLAG®. Cuando el péptido VEGF-D de longitud completa está unido a FLAG®, el fragmento se denomina en este documento VEGF-D-FULL-N-FLAG. Un fragmento preferido de VEGF-D es la porción de VEGF-D desde el resto aminoacídico 93 al resto aminoacídico 201 (es decir, el VHD (SEQ ID NO: 3)), ocasionalmente unido al péptido FLAG®.
- 15 Cuando el fragmento está unido a FLAG®, el fragmento se denomina en este documento VEGF-D Δ N Δ C.

Se debe entender que la expresión "actividad biológica de VEGF-D" se refiere a la capacidad de estimular una o más de la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de las células endoteliales o la permeabilidad vascular.

- Claramente se debe comprender que los polipéptidos que comprenden sustituciones, inserciones o deleciones conservadoras, pero que siguen manteniendo la actividad biológica de VEGF-D, están en el alcance de la invención. Los expertos en la técnica conocerán procedimientos que se pueden usar fácilmente para generar dichos polipéptidos, por ejemplo, el uso de mutagenia dirigida al sitio, o escisión y ligadura enzimáticas específicas. El experto también sabrá que los compuestos péptidomiméticos o los compuestos en los que uno o más residuos de aminoácidos son sustituidos con un aminoácido que no es de origen natural o por un análogo de un aminoácido pueden conservar los aspectos necesarios de la actividad biológica de VEGF-D. Dichos compuestos se pueden hacer y estudiar fácilmente mediante procedimientos conocidos en la técnica.
- 20
- 25

Preferiblemente cuando se usa la sustitución de un aminoácido, esta sustitución es conservadora, es decir, un aminoácido es reemplazado por otro de tamaño similar y con propiedades de carga similares.

- Como se usa en este documento, la expresión "sustitución conservadora" representa el reemplazo de un resto aminoacídico por otro resto biológicamente similar. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares. Los aminoácidos hidrófilos neutros que se pueden sustituir entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. La expresión "sustitución conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido de partida no sustituido.
- 30

- 35 Como tal, se debe comprender que en el contexto de la presente descripción se reconoce en la técnica que la sustitución conservadora es la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades similares. En la siguiente Tabla A, del documento WO 97/09433, se representan sustituciones conservadoras ejemplares.

Tabla A

Sustituciones conservadoras I		AMINOÁCIDO
CARACTERÍSTICAS DE LA CADENA LATERAL		
Alifática		
	No polar	G A P I L V
	Polar-sin carga	C S T M N Q
	Polar-cargada	D E K R
Aromática		H F W Y
Otra		M Q D E

- 40 Como alternativa, los aminoácidos conservadores se pueden agrupar como describe Lehninger (Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc., NY:NY (1975), PP. 71-77), según se representa en la siguiente Tabla B.

Tabla B

Sustituciones conservadoras II		AMINOÁCIDO
CARACTERÍSTICAS DE LA CADENA LATERAL		
No polar (hidrófobo)		
A. Alifática:		A L I V P
B. Aromática:		F W
C. Que contiene azufre:		M
D. Indefinida:		G
Polar sin carga		
A. Hidroxilo:		S T Y
B. Amidas:		N Q
C. Sulfhidrilo:		C
D. Indefinida:		G
Con carga positiva (básica):		K R H
Con carga negativa (ácida):		D E

En la siguiente Tabla C se representan ejemplos de sustituciones conservadoras.

Tabla C

Sustituciones conservadoras III	
Residuo original	Ejemplo de sustitución
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

5

Se describen posibles formas variantes del polipéptido VEGF-D que se pueden deber a la división alternativa, al igual que se sabe que ocurre con VEGF y con VEGF-D, y las variantes alélicas de origen natural de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica VEGF-D. Las variantes alélicas son bien conocidas en la técnica, y representan formas alternativas de una secuencia de ácidos nucleicos que comprenden sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, pero que no producen ninguna alteración sustancial de la función del polipéptido codificado.

10

Dichas formas variantes de VEGF-D se pueden preparar dianizando regiones no esenciales del polipéptido VEGF-D para su modificación. Se espera que estas regiones no esenciales estén fuera de las regiones muy conservadas. En particular, los factores de crecimiento de la familia PDFG/VEGF, incluyendo VEGF, son diméricos, y VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDFG-A y PDFG-B muestran la conservación completa de ocho residuos de cisteína en los dominios N-terminales, es decir, los dominios similares a PDFG/VEGF (Olofsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2576-2581, 1996; Joukov y col., *EMBO J.*, 1996, 15: 290-298). Se piensa que estas cisteínas participan en la unión de disulfuro intramolecular e intermolecular. Además, hay más residuos de cisteína muy conservados, aunque no completamente, en los dominios C-terminales. Los bucles 1, 2 y 3 de cada subunidad VHD, que están formados por la unión de disulfuro intramoleculares, participan en la unión a los receptores de la familia PDFG/VEGF de factores de crecimiento (Andersson y col., *Growth Factors*, **12**: 159-164, 1995).

15

20

Por lo tanto, los expertos en la técnica saben bien que estos residuos de cisteína se deben conservar en cualquier forma variante propuesta, y que los sitios activos presentes en los bucles 1, 2 y 3 también se deben conservar. Sin embargo, se puede esperar que otras regiones de la molécula tengan una menor importancia para su función biológica, y por lo tanto ofrecen dianas adecuadas para su modificación. Se puede estudiar fácilmente la capacidad de los polipéptidos modificados de mostrar la actividad biológica de VEGF-D mediante los procedimientos de ensayos rutinarios de

25

actividad, tales como el ensayo de proliferación de células endoteliales.

Se ha mostrado que hay una intensa señal de VEGF-D en un subconjunto de células hematopoyéticas. Estas células fluyen hacia las regiones periféricas de algunos tumores en un tipo de respuesta inflamatoria. Por lo tanto, la inhibición de este proceso sería útil cuando sea deseable impedir esta respuesta inflamatoria.

- 5 Por consiguiente, en este documento también se describe un procedimiento para inhibir la respuesta inflamatoria causada por este subconjunto de células hematopoyéticas de estos tumores, que comprende inhibir la expresión o actividad de VEGF-D por este subconjunto de células hematopoyéticas. Se contempla que la inhibición de este tipo de respuesta inflamatoria podría usarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis.

- 10 Los anticuerpos de acuerdo con la descripción también puede marcarse con un marcador detectable, y utilizarse con fines de diagnóstico. El anticuerpo puede acoplarse covalentemente o no covalentemente a un agente supermagnético, paramagnético, de densidad de electrones, ecogénico o radiactivo adecuado para el diagnóstico por imagen. Para su uso en ensayos diagnósticos, pueden usarse marcadores radiactivos o no radiactivos. Los ejemplos de marcadores radiactivos incluyen un átomo o grupo radiactivo, tal como ^{125}I o ^{32}P . Los ejemplos de marcadores no radiactivos incluyen marcadores de enzimas, tales como peroxidasa de rábano rústico, o marcadores fluorométricos, tales como fluoresceína-5-isocianato (FICT). El marcado puede ser directo o indirecto, covalente o no covalente.

- 15 La descripción también se refiere a un procedimiento para tratar un organismo, por ejemplo un mamífero, que padece una enfermedad neoplásica que se caracteriza por la expresión de VEGF-D por un tumor seleccionado entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer de endometrio, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-D en la proximidad de dicho tumor para impedir la unión de VEGF-D a su receptor correspondiente. Si se desea, se puede administrar simultáneamente un agente citotóxico con un antagonista de VEGF-D. Un antagonista preferido de VEGF-D es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a VEGF-D y bloquea la unión de VEGF-D al receptor 2 de VEGF o al receptor 3 de VEGF, especialmente un anticuerpo que se une al dominio de homología de VEGF de VEGF-D.

- 20 La descripción también se refiere a un procedimiento de cribado de un tumor seleccionado entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer de endometrio para observar su riesgo metastásico, que comprende exponer una muestra tumoral a una composición que comprende un compuesto que se une específicamente a VEGF-D, lavar la muestra, y cribar el riesgo metastásico; detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho compuesto en dicha muestra; indicando la expresión de VEGF-D por el tumor el riesgo metastásico. Un compuesto preferido descrito en este documento es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a VEGF-D, especialmente un anticuerpo que se une al dominio de homología de VEGF de VEGF-D y está marcado con un marcador detectable.

- 25 La descripción también se refiere a un procedimiento de detección de micro-metástasis de un estado de enfermedad neoplásica caracterizado por un aumento en la expresión de VEGF-D y se selecciona entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata o cáncer de endometrio, que comprende obtener una muestra de tejido de un sitio separado de un crecimiento neoplásico, tal como un ganglio linfático del tejido que rodea dicho crecimiento neoplásico, en un organismo en dicho estado de enfermedad neoplásica, exponer la muestra a una composición que comprende un compuesto que se une específicamente a VEGF-D, lavar la muestra, y cribar dicha metástasis de dicha enfermedad neoplásica detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho compuesto en la muestra de tejido; siendo la detección de VEGF-D en la muestra de tejido indicativa de la metástasis de dicha enfermedad neoplásica. De nuevo, un compuesto preferido comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a VEGF-D, especialmente un anticuerpo que se une al dominio de homología de VEGF de VEGF-D y que está marcado con un marcador detectable.

Se comprenderá claramente que para los fines de esta memoria descriptiva la expresión "que comprende" significa "que incluye, pero sin limitación". Se aplica el significado correspondiente a la palabra "comprende".

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es la representación esquemática del procesado de VEGF-D;

la Figura 2 muestra la especificidad de MAb 4A5 para el dominio de homología de VEGF/PDFG (VHD) del VEGF-D humano, según se evalúa mediante análisis de transferencia de Western;

- 50 la Figura 3 muestra autorradiografías obtenidas después de dos días de exposición a secciones de tejido de ratón de 15,5 días post-coito hibridadas con ARN no codificante y codificante de VEGF-D;

las Figuras 4A-4D muestran los resultados del análisis de la distribución del ARNm de VEGF-D en el embrión de ratón a los 15,5 días después del coito mediante hibridación *in situ*;

las Figuras 5A-5H muestran los resultados del análisis inmunohistoquímico de dos melanomas malignos que ilustran los diferentes patrones de reacción;

las Figuras 6A-6F muestran la localización de VEGF-D en el carcinoma de células escamosas del pulmón;

las Figuras 7A-7F muestran la localización de VEGF-D en el carcinoma ductal de mama *in situ*;

la Figura 8 muestra la localización de VEGF-D en el adenocarcinoma de endometrio *in situ*;

las Figuras 9A-9F muestran la localización de VEGF-D en el tejido de colon normal.

- 5 La Figura 10 muestra los resultados del análisis de tumores en ratones SCID que se producen mediante la inyección de células 293 progenitoras no transfectadas (denominadas "293") y de células 293 transfectadas con un vector de expresión que codifica VEGF-D-FULL-N-FLAG (denominadas "VEGF-D-293").

La Figura 11 muestra un tumor producido por células VEGF-D Δ N Δ C.

La Figura 12 muestra un tumor normal.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Ejemplo 1. Producción de anticuerpos monoclonales que se unen al VEGF-D humano

A fin de detectar el dominio de homología de VEGF/PDFG (VHD) en lugar de los propéptidos N- y C-terminal, se cultivaron en ratones anticuerpos monoclonales frente a la forma madura de VEGF-D (residuos 93 a 201 del VEGF-D de longitud completa (SEQ ID NO: 2), es decir, con eliminación de las regiones N- y C-terminal). Se amplificó un fragmento de ADN que codifica los residuos 93 a 201 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN polimerasa *Pfu*, usando como plantilla un plásmido que comprende el ADNc del VEGF-D humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1). El fragmento de ADN amplificado, cuya corrección se confirmó mediante secuenciación de los nucleótidos, después se insertó en el vector de expresión pEFBOSSFLAG (un regalo de la Dra. Clare McFarlane del Walter y Eliza Hall Institute for Medical Research (WEHI), Melbourne, Australia) para obtener un plásmido denominado pEFBOSVGEFG-D Δ N Δ C. El vector pEFBOSVGEFG contiene ADN que codifica la secuencia de señales para la secreción de proteínas por el gen de la interleucina-3 (IL-3) y el octapéptido FLAG® (Sigma-Aldrich). El octapéptido FLAG® se puede reconocer con anticuerpos disponibles comercialmente como el anticuerpo monoclonal M2 (Sigma-Aldrich). El fragmento VEGF-D PCR se insertó en el vector de modo que la secuencia de la señal de IL-3 estaba inmediatamente corriente arriba del octapéptido FLAG®, que a su vez estaba inmediatamente corriente arriba de la secuencia truncada de VEGF-D. Las tres secuencias estaban en el mismo marco de lectura, de modo que la traducción del ARNm que se producía por la transfección de pEFBOSVGEFG-D Δ N Δ C en células de mamífero daría lugar a una proteína que tendría la secuencia de señal de IL-3 en su extremo N-terminal, seguida del octapéptido FLAG® y de la secuencia del VEGF-D truncado. La escisión de la secuencia de señal y la posterior secreción de la proteína desde la célula daría lugar a un polipéptido VEGF-D que está marcado con el octapéptido FLAG® adyacente al extremo N-terminal. Se purificó el VEGF-D Δ N Δ C mediante cromatografía de afinidad anti-FLAG® a partir del medio de células COS que se habían transfectado de manera transitoria con el plásmido pEFBOSVGEFG-D Δ N Δ C (véase el Ejemplo 9 de la Solicitud de Patente Internacional WO 98/07832).

Se usó el VEGF-D Δ N Δ C purificado para inmunizar ratones hembra Balb/C el día 85 (por vía intraperitoneal), 71 (intraperitoneal) y 4 (intravenosa) antes de la recogida de las células esplénicas de los ratones inmunizados y la posterior fusión de estas células esplénicas con células de mieloma murino P3X63Ag8.653 (NS-1). Para las dos primeras inmunizaciones se inyectaron aproximadamente 10 μ g de VEGF-D Δ N Δ C en una mezcla 1:1 de PBS y adyuvante TiterMax (#R-1 Research Adjuvant; CytRx Corp., Norcross, GA), mientras que para la tercera inmunización se usaron 35 μ g de VEGF-D Δ N Δ C en PBS.

Se seleccionaron los anticuerpos monoclonales frente a VEGF-D Δ N Δ C realizando el cribado de los hibridomas sobre VEGF-D Δ N Δ C purificado usando un inmunoensayo enzimático. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con VEGF-D Δ N Δ C, se añadieron sobrenadantes de hibridoma y se incubaron durante dos horas a 4 °C seguido de seis lavados en PBS con Tween 20 al 0,02%. A continuación se incubó con Ig anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano rústico (Bio-Rad, Hercules, CA) durante una hora a 4 °C. Después del lavado, el ensayo se desarrolló con un sistema de sustrato de 2,2'-azino-di(ácido 3-etilbenzotiazolinsulfónico) (ABTS) (Zymed, San Francisco, CA), y se cuantificó el ensayo leyendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de múltiples pocillos (Flow Laboratories MCC/340, McLean, VA). Se seleccionaron seis anticuerpos para el análisis posterior y se subclonaron dos veces mediante dilución limitante. Estos anticuerpos se denominaron 2F8, 3C10, 4A5, 4E10, 4H4 y 5F12. Se determinaron los isotipos de los anticuerpos usando un kit de isotipado Isostrip™ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Los anticuerpos 2F8, 4A5, 4E10 y 5F12 eran de la clase IgG₁, mientras que 4H4 y 3C10 eran de la clase IgM. Los seis anticuerpos contenían la cadena ligera kappa.

Se cultivaron líneas celulares de hibridoma en medio DMEM que contenía suero deplecionado de IgG al 5% v/v (Gibco BRL, Galthesburg, MD), L-glutamina 5 mM, 50 μ g/ml de gentamicina e IL-6 recombinante 10 μ g/ml. Los anticuerpos 2F8, 4A5, 4E10 y 5F12 se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando proteína de G-Sepharose según la técnica de Darby, *J. Immunol. Methods.*, **159**: 125-129, 1993, y el rendimiento se evaluó midiendo la absorción a 281 nm.

Ejemplo 2. Especificidad de 4A5

Se evaluó la especificidad del MAb 4A5 (renombrado VD1) por el VHD del VEGF-D humano mediante análisis de transferencia Western. Los derivados de VEGF-D que se usaron fueron VEGF-D Δ N Δ C, que consistía en residuos de los aminoácidos 93 a 201 del VEGF-D humano marcado en el extremo N-terminal con el octapéptido FLAG® (Ejemplo 1), VEGF-D-FULL-N-FLAG, que consistía en VEGF-D de longitud completa marcado en el extremo N-terminal con FLAG® (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999) y VEGF-D-CPRO, que consistía en el propéptido C-terminal, de los residuos de los aminoácidos 206 a 354, que también se marcó con FLAG® en el extremo N-terminal. Estas proteínas se expresaron en células 293-EBNA-1, se purificaron mediante cromatografía de afinidad con MAb M2 (anti-FLAG®) (IBI/Kodak, New Haven, CT) usando el procedimiento que expuesto en Achen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 548-553, 1998. Se analizaron cincuenta nanogramos de VEGF-D-FULL-N-FLAG (FM), VEGF-D Δ N Δ C ($\Delta\Delta$) y de VEGF-D-CPRO (CP) purificados mediante SDS-PAGE (reductora) y mediante inmunotransferencia de Western usando el MAb VD1 y un MAb M2 biotinilado como control (el anticuerpo que se usó para la inmunotransferencia se indica en la parte inferior del panel de la Figura 2). Los análisis mediante SDS-Page y mediante inmunotransferencia de Western se realizaron como se describe en Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999.

Como se muestra en la Figura 2, la especie predominante de la muestra de VEGF-D-FULL-N-FLAG está formada por VEGF-D no procesado (M_r ~53 K), VEGF-D parcialmente procesado que contiene tanto el propéptido N-terminal como el VHD (~31 K) y el propéptido N-terminal (~10 K) (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999), todos los cuales se detectan con el MAb M2 porque están marcados con el octapéptido FLAG® (flechas de la izquierda, los números representan M_r en K y los superíndices indican la muestra en la que se detecta la banda). Del mismo modo, VEGF-D Δ N Δ C (~21 K.) y VEGF-D-CPRO (dos bandas de ~31 y ~29 K que se originan debido a la glucosilación diferencial) se detectan con M2 (flechas de la izquierda) porque estos polipéptidos también están marcados con FLAG®. VD1 detecta al VEGF-D no procesado, al VEGF-D parcialmente procesado y al VEGF-D Δ N Δ C, pero no al propéptido N-terminal (~10 K) de la preparación de VEGF-D-FULL-N-FLAG, ni el propéptido C-terminal de la muestra de VEGF-D-CPRO (~31 y ~29 K). Los resultados con VEGF-D-FULL-N-FLAG se analizaron con exposiciones largas (L) y cortas (C). Las posiciones de los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha en la Figura 2.

Así, el MAb VD1 se une al VEGF-D no procesado, a las formas parcialmente procesadas que contienen el VHD y al VEGF-D totalmente procesado, pero no a los propéptidos N- o C-terminales. Además, el MAb VD1 fue capaz de producir inmunoprecipitación del VEGF-D Δ N Δ C humano nativo, pero no del VHD del VEGF-C humano (VEGF-C Δ N Δ C) (Joukov y col., *EMBO J*, **16**: 3898-3911, 1997) en un inmunoensayo enzimático que indica que VD1 es específico para VEGF-D.

Ejemplo 3. Estudios de hibridación *in situ* de la expresión del gen de VEGF-D en embriones de ratón

Se estudió el patrón de expresión del gen de VEGF-D mediante hibridación *in situ* usando una sonda de ARN no codificante radiomarcada que correspondía a los nucleótidos 1 a 340 del ADNc de VEGF-D1 de ratón (SEQ ID NO: 4). El ARN no codificante se sintetizó mediante transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T3 y [³⁵S]UTP α s. El VEGF-D de ratón se describe totalmente en la Solicitud de Patente Internacional WO 98/07832. Esta sonda de ARN no codificante se hibridó con secciones de tejido incluidas en parafina de embriones de ratón el día 15,5 después del coito. Las secciones marcadas se sometieron a autorradiografía durante dos días. En la Figura 3 se muestran las autorradiografías resultantes para las secciones que se hibridaron con el ARN no codificante y con el ARN codificante complementario (como control negativo). En la Figura 3, "L" representa el pulmón y "Sk" representa la piel, y las dos secciones tisulares que se muestran son secciones seriadas. Se detectaron señales intensas del ARNm de VEGF-D en el pulmón en desarrollo y se asociaron a la piel. No se detectaron señales usando el ARN codificante control.

En las figuras 4A-4D se hibridaron secciones tisulares sagitales con la sonda de ARN no codificante de VEGF-D y posteriormente se incubaron con una emulsión fotográfica, se revelaron y se tiñeron. La ampliación de las Figuras 4A y 4D es de 40x, para la Figura 4B es de 200x y para la Figura 4C es de 500x.

En la Figura 4A, la micrografía de campo oscuro muestra una señal intensa para el ARNm de VEGF-D en el pulmón (Lu) También se muestran el hígado (Li) y las costillas (R). La Figura 4B muestra el pulmón a mayor aumento. Esta micrografía de campo claro muestra un bronquio (Br) y una arteria bronquial (BA). El perfil negro de un rectángulo representa la región de la sección que se muestra en la Figura 4C, pero con un mayor aumento. La Figura 4C muestra las células epiteliales del bronquio (Ep), las células musculares lisas en desarrollo (SM) que rodean a la capa de células epiteliales y las células mesenquimatosas (Mes). Es evidente la abundancia de granos de plata asociados a las células mesenquimatosas. Así, el análisis microscópico revela que el ARNm de VEGF-D es abundante en las células mesenquimatosas del pulmón en desarrollo (Figuras 4A-4C). Por el contrario, las células epiteliales de los bronquios y de los bronquiolos son negativas, al igual que las zonas musculares lisas en desarrollo que rodean a los bronquios. Las células endoteliales de las arterias bronquiales también son negativas.

En la Figura 4D una micrografía de campo oscuro muestra el esbozo de una extremidad. Se localizó una señal intensa inmediatamente debajo de la piel en una región de tejido rica en fibroblastos y en melanocitos en desarrollo.

Estos resultados indican que VEGF-D puede atraer el crecimiento de los vasos sanguíneos linfáticos hacia el pulmón en desarrollo y hacia la región inmediatamente inferior a la piel. Debido a la expresión del gen de VEGF-D adyacente a la piel embrionaria, se considera que VEGF-D puede jugar una función en la inducción de la angiogénesis que está

asociada con el melanoma maligno. El melanoma maligno es un tumor altamente vascularizado. Esto sugiere que la inhibición local de la expresión de VEGF-D, por ejemplo, usando anticuerpos de VEGF-D o del receptor 2 de VEGF o el receptor 3 de VEGF, es útil en el tratamiento del melanoma maligno. También pueden usarse otros inhibidores adecuados de la actividad de VEGF-D, tales como ácidos nucleicos no codificantes o ADN de triple hebra.

5 **Ejemplo 4. Uso de anticuerpos monoclonales en VEGF-D humano para el análisis inmunohistoquímico de tumores humanos**

Para evaluar la función de VEGF-D en la angiogénesis tumoral, se usaron MAb de VEGF-D, 4A5, 5F12 y 2F8 (renombrados VD1, VD2 y VD3, respectivamente) para el análisis inmunohistoquímico de quince melanomas malignos invasivos escogidos aleatoriamente. Además, en los análisis se usaron MAb frente a VEGFR-2 humano (Sigma, St. Louis, MO) y anticuerpos policlonales frente a VEGFR-3 (anticuerpos Flt-4 anti-humanos de afinidad purificada; R & D Systems, Minneapolis, MN). Se usó un MAb cultivado en el receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos, denominado LMM774 (Layton y col., *Growth Factors* **14**: 117-130, 1997), como control negativo. Al igual que los MAb de VEGF-D, LMM774 era del isotipo IgG₁ murino y, por lo tanto, servía como un anticuerpo de control que tenía el mismo isotipo. Se usaron cinco micrómetros de secciones gruesas de tejido fijado en formalina y embebido en parafina de los melanomas malignos cutáneos como tejido de ensayo. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron de nuevo y después se lavaron con PBS. Los anticuerpos primarios se incubaron con secciones de tejido a concentraciones de 5-40 µg/ml dependiendo del tiempo de incubación. Los controles de omisión de etapa, en los que se omitieron los anticuerpos primarios, se realizaron en paralelo a los controles de adsorción, en los que los MAb de anti-VEGF-D se incubaron con un exceso molar de 40 veces de VEGF-D Δ N Δ C durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la incubación con secciones de tejido. También se realizaron los controles que tenían el mismo isotipo con el anticuerpo LMM774. La detección del anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina se consiguió usando Fast Red Substrate (Sigma, St. Louis, MO). En algunos casos, las secciones de tejido se blanquearon de melanina antes de la inmunohistoquímica por incubación en permanganato potásico al 0,25% durante 3 horas seguido de seis minutos de incubación en ácido oxálico al 1%. En estos casos, la detección del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa fue con 3,3'-diaminobenzadina (DAB) (Dako Corp., Carpintería, CA).

Se observaron reacciones positivas con los tres MAb de VEGF-D básicamente con los mismos patrones de tinción. La inmunorreactividad de VEGF-D se detectó en 13 de los 15 melanomas ensayados. Los melanomas mostraron patrones de reacción que variaban de tinción homogénea por toda la lesión a localización de la reacción en la periferia invasiva de la lesión.

Las Figuras 5A-5H muestran los resultados del análisis inmunohistoquímico de dos tumores que ilustran los diferentes patrones de reacción. La detección de los anticuerpos en las Figuras 5A y 5B fue con Fast Red Substrate (el color rojo representa una señal positiva), y en las Figuras 5C-5H fue con DAB (el color pardo representa una señal positiva). Las secciones de tejido mostradas en las Figuras 5C-5H se blanquearon de melanina antes de la incubación con el anticuerpo. El anticuerpo de VEGF-D usado en todos los paneles, excepto en las Figuras 5E y 5G, fue VD1 (4A5). Las barras de escala en la Figura 5A representan 150 µm, en las Figuras 5B-5D 20 µm y en las Figuras 5E-5H 10 µm.

Como se observa en las Figuras 5A y 5B, fue evidente una tinción heterogénea a través de la masa entera del primer melanoma. En este tumor, la tinción del VEGF-D detectado es más pronunciada en los nidos intradérmicos (cabezas de flechas de color blanco) en la periferia de las porciones invasivas de la masa entera principal del tumor, y es menos intensa o indetectable en la porción central. El VEGF-D también se detecta en los vasos de capilares más pequeños (flechas blancas) en la dermis papilar y reticular adyacente a las células tumorales de reacción positiva (Figura 5B) y en los vasos sanguíneos de paredes más gruesas de un tamaño de vénulas precapilares y poscapilares.

Como se observa en la Figura 5C, en el segundo melanoma, VEGF-D se distribuye de manera más uniforme a lo largo de toda la masa del tumor y se detectó en los vasos del tumor, así como en las células tumorales. Las regiones del estroma que se tiñeron negativas se representan por asteriscos de color negro.

Para ambos tumores que se han mencionado anteriormente, los vasos capilares dérmicos superiores y otros vasos sanguíneos a una distancia del tumor, y en la dermis reticular media y profunda lejos del tumor y las glándulas sudoríparas, mostraron una deficiente o ninguna tinción de las paredes de los vasos y no mostraron la tinción de las células endoteliales citoplasmáticas granulares observada en los vasos pequeños adyacentes a las células de tumor inmunorreactivas. Los melanocitos de unión no neoplásica también eran negativos, indicando que el VEGF-D no se expresa por este tipo de célula en la piel adulta. La Figura 5D, que es un control sección seriada para el tejido de la Figura 5C, muestra que el control de adsorción fue negativo.

Las secciones de melanoma maligno se analizaron para conocer la ubicación de VEGFR-3, un receptor para VEGF-D que se expresa en las células endoteliales de los vasos linfáticos en los tejidos adultos (Lymboussaki, A. y col., *Am. J. Pathol.* **153**: 395-403, 1998). Como se observa en la Figura 5E, el VEGFR-3 se detectó en las células endoteliales de un vaso de pared estrecha (flecha de color blanco) en el melanoma. Los vasos de VEGFR-3 positivo adyacentes a las células tumorales también eran positivos para VEGF-D (Figura 5F), como se evaluó mediante el

análisis inmunohistoquímico de las secciones seriadas, indicando que la inmunorreactividad de VEGF-D en estos vasos puede surgir debido a la captación mediada por el receptor en las células endoteliales. Además, las secciones se analizaron mediante inmunohistoquímica para conocer la ubicación de VEGFR-2. Se sabe que el VEGFR-2 se regula positivamente en el endotelio de los vasos sanguíneos en los tumores (Plate, K. y col., *Cancer Res*, **53**: 5822-5827, 1993). Como se observa en la Figura 5G, el VEGFR-2 se detectó en el endotelio de los vasos sanguíneos (flecha de color blanco) y cerca del melanoma. Algunos de los vasos que fueron inmunopositivos para VEGFR-2 también fueron positivos para VEGF-D (flecha de color blanco en la Figura 5H), indicando que la captación de VEGF-D en vasos tumorales podía medirse también por este receptor.

Ejemplo 5. VEGF-D en el cáncer de pulmón

Se piensa que la neoangiogénesis es un indicador pronóstico útil en el carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP) (Fontanini y col., *Clin. Cancer Res.*, **3**: 861-865, 1997). Por lo tanto, se analizó la localización de VEGF-D en un caso de carcinoma de células escamosas del pulmón mediante inmunohistoquímica (Figuras 6A-6F). La inmunohistoquímica se realizó como en el Ejemplo 4, excepto que también se usaron anticuerpos frente a la actina alfa del músculo liso (DAKO Corp., Carpintería, CA) para realizar la inmunotinción. El MAb anti-VEGF-D que se usó para realizar la inmunotinción en las Figuras 6A y 6D fue VD1 (4A5). La Figura 6A muestra que VEGF-D se detecta en las células tumorales que forman una isla en el centro de la fotomicrografía, en células que revisten el gran vaso adyacente y en las células del interior del estroma desmoplásico. El estroma desmoplásico está indicado por un corchete negro y el recuadro punteado indica la región que se muestra en la imagen de gran aumento de la Figura 6D. Las células inmunopositivas del estroma pueden ser miofibroblastos.

La Figura 6B muestra que se detecta VEGFR-2 en las células que revisten el gran vaso. Sin embargo, estos vasos fueron negativos para VEGFR-3 en este tumor. El recuadro punteado representa la región que se muestra a mayor aumento en la Figura 6E. La tinción control de una sección tisular del mismo caso en el que se había preincubado el MAb de VEGF-D con un exceso molar de 40 veces del VHD del VEGF-D humano no dio ninguna señal (Figura 6C).

Como se ha mencionado anteriormente, las células inmunopositivas del estroma desmoplásico pueden ser miofibroblastos. Por lo tanto, se inmunotizó el estroma desmoplásico usando MAb específicos para la actina alfa del músculo liso que detectan los miofibroblastos. Como se observa en la Figura 6F, el estroma da una tinción positiva, lo que indica la presencia de miofibroblastos. La secreción de un factor angiogénico por los componentes del estroma puede actuar amplificando el estímulo angiogénico que genera el tumor.

Ejemplo 6. VEGF-D en el cáncer de mama

También se analizó la localización de VEGF-D en el carcinoma ductal de mama *in situ* mediante inmunohistoquímica, cuyos resultados se muestran en las Figuras 7A-7F. La inmunohistoquímica se realizó como en el Ejemplo 4, con la excepción de que también se usaron MAb específicos para la actina alfa del músculo liso (DAKO Corp., Carpintería, CA) y la molécula de adhesión plaquetaria/endotelial (PECAM) (DAKO Corp., Carpintería, CA) en la inmunotinción. El MAb anti-VEGF-D que se usó para realizar la inmunotinción de la Figura 7A era VD1 (4A5).

Como se observa en la Figura 7A, se detectó VEGF-D en células tumorales de los conductos y de pequeños vasos denominados "en collar" (representados con cabezas de flecha negras) inmediatamente adyacentes a la lámina basal de los conductos llenos de tumor. Los vasos en collar también son positivos para VEGFR-2 (Figura 7C), VEGFR-3 (Figura 7D) y PECAM (Figura 7E), como indican las cabezas de flechas negras. PECAM es un marcador clásico del endotelio y también se encuentra en las plaquetas y en los leucocitos. PECAM participa en la migración de los leucocitos a los focos inflamatorios (Muller y col., *J. Exp. Med.*, **178**: 449-460, 1993). La tinción con anticuerpos frente a PECAM en los vasos en "collar" ayuda a confirmar que esas estructuras son vasos. El borde del conducto se identifica mediante la tinción para actina alfa del músculo liso (Figura 7B), que detecta los miofibroblastos. La tinción control de una sección tisular seriada que se muestra en la Figura 7A, en la que se había preincubado el MAb de VEGF-D con un exceso molar de 40 veces del VHD del VEGF-D humano no dio ninguna señal (Figura 7F). Estos hallazgos indican que VEGF-D, secretado por las células tumorales, podría activar sus receptores en los vasos en las proximidades, y de esta manera participaría en la atracción del crecimiento de los vasos en collar en sus posiciones muy cerca de los conductos. Esto podría ser importante tanto para el crecimiento de los tumores sólidos como para la diseminación metastásica.

Ejemplo 7. VEGF-D en el cáncer de endometrio

También se detectó VEGF-D en el adenocarcinoma de endometrio (Figura 8). La inmunohistoquímica se realizó como en el Ejemplo 4 usando el MAb de anti-VEGF-D VD1 (4A5). Se observó una tinción moderada para VEGF-D en las células tumorales glandulares (GL), se observó una reactividad muy intensa en los miofibroblastos del estroma desmoplásico (DM) en el borde invasivo progresivo del tumor y una intensa reactividad en el endotelio y en las paredes de los vasos sanguíneos adyacentes (flechas negras) en el miometrio (Myo). De manera interesante, la reactividad de VEGF-D fue particularmente intensa en los miofibroblastos del estroma desmoplásico, lo que indica que las células tumorales glandulares pueden inducir la expresión de VEGF-D en estos fibroblastos, que amplificarían el potencial angiogénico del tumor. Como también se detectó expresión de VEGF-D en las células del estroma desmoplásico en el carcinoma de pulmón (Figura 6A), puede ocurrir que diversos tumores puedan inducir VEGF-D en los componentes del estroma. Esto es análogo al pulmón en desarrollo, en el que las células mesenquimatosas, probablemente precursoras de fibroblastos,

expresan intensamente el gen de VEGF-D. Por lo tanto, las señales de tejidos embrionarios y de tejidos tumorales pueden inducir la expresión de VEGF-D en los fibroblastos.

Ejemplo 8. VEGF-D en tejidos no tumorigénicos

5 Los tejidos con una carga alta de células de renovación y/o metabólicas, tales como el colon, requieren una extensa red vascular. Por lo tanto, el colon humano se analizó para conocer la ubicación de VEGF-D mediante inmunohistoquímica, cuyos resultados se muestran en las Figuras 9A-9F. La inmunohistoquímica se realizó como en el Ejemplo 4, con la excepción de que los anticuerpos específicos para la actina alfa del músculo liso (DAKO Corp., Carpintería, CA) también se usaron para la inmunotinción. Para todas las secciones de tejido mostradas, la detección se realizó con DAB (el color pardo representa una señal positiva) y para las Figuras 9A, 9B, 9C y 9F, el anticuerpo de VEGF-D usado fue VD1 (4A5). Por motivos de claridad, se omitió la contratinción en las Figuras 9A, 9B, 9D y 9F. La barra de escala en la Figura 9A representa 120 μm , en las Figuras 9B, 9D y 9F representa 40 μm y en las Figuras 9C y 9E representa 6 μm .

15 El VEGF-D se localizó en los vasos sanguíneos de la submucosa (Figura 9A). Un análisis a más potencia revela la tinción del músculo liso vascular (cabezas de flechas de color blanco); pero no de las células endoteliales (cabezas de flechas de color negro) en las arteriolas (Figuras 9B y 9C). La tinción de una sección seriada con respecto a la que se muestra en las Figuras S 9A-9C con un anticuerpo específico para la actina alfa del músculo liso detecta el músculo liso vascular (cabezas de flechas de color blanco) pero no el endotelio (cabezas de flechas de color negro) (Figuras 9D y 9E). Esta tinción demuestra que la reactividad de VEGF-D se produjo en las células del músculo liso vascular de las arteriolas. Además, estas células endoteliales no mostraron inmunorreactividad ni para VEGFR-2 ni para VEGFR-3; indicando que estas células no pueden acumular VEGF-D de un modo mediado por el receptor. La incubación previa del MA b de VEGF-D con un exceso molar de 40 veces del VHD de VEGF-D humano bloquea completamente la tinción del músculo liso vascular (Figura 9F).

20 Debido a que el colon se somete a una diversidad de agresiones, algunas de las cuales causan una lesión vascular, el VEGF-D en la submucosa puede producirse por las células del músculo liso vascular en la preparación para la regeneración vascular. Tras la activación del endotelio en respuesta a una lesión vascular, la regulación positiva de VEGFR-2 en las células endoteliales de estos vasos permitirá al VEGF-D, producido por el músculo liso vascular, inducir una proliferación de células endoteliales y la reparación de los vasos. La regulación positiva de VEGFR-2 por el endotelio de arteriolas y microvasos pequeños en respuesta a una lesión arterial se ha indicado previamente en el contexto del ictus isquémico (Issa, R. y col., *Lab Invest* **79**: 417-425, 1999).

Ejemplo 9. Función de VEGF-D en el desarrollo tumoral

30 A fin de generar líneas celulares que sobreexpresan de manera constitutiva derivados de VEGF-D, se insertaron regiones del ADNc del VEGF-D humano en el vector de expresión en mamíferos Apex-3 (Evans y col., *Mol. Immunol.*, **32**: 1183-1195, 1995). Este vector se mantiene episómicamente cuando se transfecta en líneas de células renales embrionarias humanas 293-EBNA. Para la expresión de VEGF-D maduro, se insertó la región de pEFBOSVEGF-D Δ N Δ C que contenía las secuencias que codifican la secuencia de la señal de IL-3, el octapéptido FLAG® y el VEGF-D maduro en el punto X_{Bai} de Apex-3 (véase el Ejemplo 9 de la Solicitud de Patente Internacional WO 98/07832). El plásmido resultante se denominó pVDA-pexD Δ N Δ C (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999, y véase el Ejemplo 1 de la Solicitud de Patente Internacional WO 99/33485). Se hizo una construcción similar para la expresión del VEGF-D de longitud completa no procesado marcado en el extremo N-terminal con FLAG®. En esta construcción, el ADN que codifica la secuencia de la señal de VEGF-D para la secreción de proteínas se eliminó y se substituyó por ADN que codifica la secuencia de la señal de IL-3, seguida del octapéptido FLAG® y de dos aminoácidos (Thr-Arg) inmediatamente en la dirección 5' y en el mismo marco de lectura que el ADN que codifica los residuos 24-354 del VEGF-D. Esta construcción se denominó pVDAApexFull-N-Flag (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999, y véase el Ejemplo 1 de la Solicitud de Patente Internacional WO 99/33485). Estos vectores se transfectaron en células de la línea celular de riñón embrionario humano 293EBNA-1 por el procedimiento de fosfato cálcico o con Fugene®, según las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), y se seleccionaron transfectantes estables en presencia de DMEM complementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina. Posteriormente se identificaron líneas celulares que expresan concentraciones elevadas de VEGF-D-Full-N-Flag y de VEGF-D Δ N Δ C mediante marcado metabólico, inmunoprecipitación y análisis de inmunotransferencia de Western (Stacker, S.A., y col., *J. Biol. Chem.*, **274**: 32127-32136, 1999, y véase el Ejemplo 1 de la Solicitud de Patente Internacional WO 99/33485).

55 Se inyectaron por vía subcutánea 2×10^7 células 293 transfectadas o células 293 progenitoras no transfectadas en PBS en ratones SCID de 6 a 8 semanas de edad (ARC, Perth, Australia) en la almohadilla grasa mamaria. Los tumores dejaron crecer y se midieron con calibres digitales, en un periodo de tres semanas. Los experimentos se interrumpieron después de tres semanas, cuando el primer animal alcanzó el máximo tamaño que permite el Comité Institucional de Ética. Se calculó el tamaño del tumor como anchura x longitud x 0,6 x (anchura x longitud)/2.

La Figura 10 muestra los resultados del análisis de los tumores en ratones SCID producidos por la inyección de células 293 progenitoras y de células 293 no transfectadas (denominadas "293") o de células 293 transfectadas con la construcción que codifica VEGF-D-FULL-N-FLAG (denominadas "VEGF-D-293"). Hay una diferencia significativa entre

los tumores procedentes de las células 293-VEFG-D-FULL-N-FLAG y los que proceden de las células 293 no transfectadas. Después de tres semanas el tamaño tumoral medio de los tumores del grupo de 293-VEFG-D-FULL-N-FLAG fue de $937 \pm 555 \text{ mm}^3$ (media \pm desviación típica, $n = 8$), en comparación con $136 \pm 230 \text{ mm}^3$ para las células no transfectadas ($n = 8$). De manera interesante, los tumores que se generaron a partir de células 293 transfectadas con una construcción que codifica VEGF-D Δ N Δ C no tuvieron un tamaño significativamente diferente, $50 \pm 76 \text{ mm}^3$ ($n = 7$), con respecto a los que procedían de células 293 no transfectadas.

Además, el aspecto macroscópico de los tumores procedentes de las células 293 no transfectadas fue el de una superficie blanca pálida, en comparación con los tumores procedentes de las células 293-VEFG-D-FULL-N-FLAG, que tenían un aspecto hemorrágico, y era evidente la presencia de vasos sanguíneos en todo el tumor.

También se analizaron secciones mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal anti-PECAM (Pharmingen, San Diego, CA), un marcador de células endoteliales. Las secciones de los tumores que se habían generado con células 293-VEFG-D-FULL-N-FLAG demostraron un marcado aumento de la expresión de PECAM en comparación con los tumores que se habían generado con células progenitoras 293 no transfectadas. Este análisis confirma la abundancia mucho mayor de vasos sanguíneos en los tumores que expresan VEGF-D de longitud completa no procesado.

Este experimento indica que la forma no procesada de VEGF-D es capaz de inducir la angiogénesis tumoral y el crecimiento de un tumor sólido *in vivo*. De manera interesante, los tumores procedentes de células que expresan la forma madura y totalmente procesada de VEGF-D no mostraron ningún aumento del crecimiento en comparación con las células progenitoras 293 no transfectadas. Esto indica la importancia de los propéptidos (N-pro y C-pro) en el VEGF-D para la localización o funcionamiento correctos del VHD de VEGF-D. Una explicación de este resultado es que los propéptidos participan en la asociación con la matriz, y sólo cuando el VEGF-D está situado correctamente sobre los proteoglicanos de sulfato de heparina de la matriz extracelular o de la superficie celular el factor de crecimiento puede inducir la angiogénesis y/o la linfangiogénesis. Una explicación alternativa es que los propéptidos aumentan la semivida del VHD del VEGF-D *in vivo*.

Ejemplo 10. Inducción por VEGF-D de la angiogénesis tumoral

Para determinar si VEGF-D participa en la angiogénesis tumoral, se generaron líneas celulares 293EBNA que expresan VEGF o VEGF-D. Las células 293EBNA normalmente no expresan concentraciones detectables de VEGF, VEGF-C ni de VEGF-D, los ligandos que activan VEGFR-2 y/o VEGFR-3 (Stacker, S.A., y col., *Growth Factors*, **17**: 1-11, 1999). Las células 293EBNA produjeron tumores de aspecto epitelioides de crecimiento lento y mal vascularizados en ratones inmunodeficientes. El análisis de inmunotransferencia de Western de medio acondicionado procedente de las líneas celulares 293EBNA generadas *in vitro* mostró que se secretaban las formas maduras de los factores de crecimiento activos.

Se colocaron ratones hembras de entre seis y veintiuna semanas de edad SCID o SCID/nod (Animal Resources Center, Canning Vale, Australia; Austin Research Institute, Australia; y Eliza Hall Institute for Medical Research, Australia) en grupos de 6 a 10 ratones y se les inyectaron por vía subcutánea en la almohadilla grasa mamaria líneas celulares que expresan VEGF-293, VEGF-D-293, o líneas celulares 293 controles a una concentración de $2,0\text{-}2,5 \times 10^7$ en el medio de cultivo. Se analizó el crecimiento tumoral y la morfología durante 35 días. Se midieron los tumores con calibres digitales y se calculó el volumen tumoral con la fórmula: volumen = longitud x anchura² x 0,52. Se sacrificó a los ratones entre tres y cinco semanas después de la inyección con líneas celulares, y los tumores se retiraron para su examen. Los tumores asociados a VEGF-D-293 y 293 se extirparon después de la muerte el día 25 y se pesaron.

Las células VEGF-293 producían tumores que tenían una mayor velocidad de crecimiento que los que producían las células 293 de control. Los tumores VEGF-293 estaban muy vascularizados y tenían un edema extenso, lo que es compatible con que VEGF es un potente factor de la angiogénesis tumoral e inductor de la permeabilidad vascular. Las células VEGF-D-293 también mostraron estimulación del crecimiento *in vivo* y los tumores estaban muy vascularizados en comparación con los tumores 293 de control, aunque no mostraron datos macroscópicos ni microscópicos de edema.

El crecimiento tumoral que se produce por la inyección de células VEGF-D-293 se bloqueó mediante inyecciones peritoneales dos veces a la semana del anticuerpo monoclonal VD1, que es un anticuerpo específico frente a la región bioactiva de VEGF-D y que bloquea la unión de VEGF-D a VEGFR-2 y VEGFR-3. Sin embargo, el crecimiento tumoral no se vio afectado por el tratamiento con un anticuerpo control que tenía el mismo isotipo.

El tratamiento con el anticuerpo VD1 redujo la abundancia de vasos en los tumores, según se evaluó mediante inmunohistoquímica para el marcador de las células endoteliales PECAM-1. La inmunotransferencia de Western demostró la expresión de VEGF-D y de VEGF en tumores VEGF-D-293 y VEGF-293, respectivamente, y también que VEGF no estaba regulado positivamente en los tumores VEGF-D-293. El análisis del peso de los tumores después de la muerte demostró una diferencia significativa entre los tumores VEGF-D-293 ($0,49 \pm 0,22 \text{ g}$, $n = 7$; media \pm DT) y los tumores 293 de control ($0,123 \pm 0,118 \text{ g}$, $n = 9$, $p = 0,01$).

Ejemplo 11. Inducción por VEGF-D de linfangiogénesis tumoral.

Como las metástasis a los ganglios linfáticos locales a través de los vasos linfáticos son una etapa frecuente en la

diseminación de los tumores sólidos, se realizaron experimentos para determinar si VEGF-D inducía la linfangiogénesis tumoral, o si la expresión de VEGF-D en las células tumorales daba lugar a la diseminación del tumoral hacia los ganglios linfáticos.

5 Para analizar la función de VEGF-D en la diseminación tumoral, se indujeron tumores VEGF-D-293 en ratones SCID/nod (Animal Resources Center, Canning Vale, Australia; Austin Research Institute, Australia; y Eliza Hall Institute for Medical Research, Australia). Los análisis post-mortem mostraron que los animales que tenían tumores VEGF-D-293 habían desarrollado lesiones metastásicas en el ganglio linfático axilar lateral y/o en los ganglios linfáticos inguinales superficiales en 14 de 23 animales, en comparación con 0 de 16 animales que tenían tumores VEGF-293 y en 0 de 14 animales que tenían tumores 293. En algunos casos la diseminación metastásica de las células tumorales desde el tumor primario en ratones se pudo ver como un reguero de células tumorales en los linfáticos de la piel entre el tumor primario y el ganglio axilar lateral.

15 El tratamiento de ratones que albergaban tumores VEGF-D-293 con el anticuerpo monoclonal VD1 (Tabla 1) bloqueó la diseminación metastásica a los ganglios linfáticos. Ninguno de los 7 ratones a los que se trató durante 25 días con VD1 mostró diseminación metastásica linfática, mientras que 6 de 10 ratones a los que se trató con un anticuerpo monoclonal de control del mismo isotipo mostraron diseminación linfática. Estos resultados indican que VEGF-D puede promover la diseminación metastásica de estos tumores a través del sistema linfático.

Tabla 1: Diseminación metastásica de tumores en ratones SCID/NOC

Línea tumoral	Número de ratones con tumores primarios	Número de ratones con diseminación a los ganglios linfáticos locales
VEGF-D-293	23	14 (61%)
VEGF-D-293 (tratados con VD1) ^a	7	0
VEGF-D-293 (tratados con LMM774) ^b	10	6 (60%)

^a Se inyectaron anticuerpos monoclonales purificados dos veces a la semana durante el transcurso del experimento, comenzando un día después de la inyección de las células tumorales. VD1 es un anticuerpo monoclonal neutralizador de VEGF-D.

^b LMM774 es un anticuerpo monoclonal control con compatibilidad de isotipo que no bloquea VEGF-D.

20 Los datos muestran que la expresión de VEGF-D puede promover la diseminación metastásica de las células tumorales a través de la red linfática. VEGF-D indujo la formación de vasos linfáticos en los tumores, como se detectó mediante inmunohistoquímica para el marcador específico de los linfáticos LYVE-1, probablemente a través del receptor linfático VEGFR-3, aunque no se puede excluir la activación de heterodímeros de VEGFR-3-VEGFR-2. La expresión de factores linfangiogénicos por sí misma es suficiente para inducir la formación de vasos linfáticos el centro de un tumor y para facilitar la diseminación metastásica a los ganglios linfáticos.

25 VEGF-D se localizó en las células tumorales y el endotelio de los vasos en el melanoma maligno, los cánceres de pulmón y de mama (véanse los Ejemplo 4-6).

Ejemplo 12. Variabilidad de las características de los tumores inducidos por diferentes formas de VEGF-D

30 Además de la determinación de la función de VEGF-D en la angiogénesis y la linfangiogénesis tumorales, se usaron los procedimientos del Ejemplo 10 y 11 para producir y evaluar tumores que expresan diferentes formas de VEGF-D que representan la escisión de los propéptidos N-, C- y N- y C-terminales. Las líneas celulares que se inyectaron en los ratones eran 293EBNA, VEGF-D-293, VEGF-D Δ N Δ C-293, VEGF-D Δ C-293 (células que expresan VEGF-D pero que carecen del propéptido C-terminal), y células VEGF-D Δ N-293 (células que expresan VEGF-D y que carecen del propéptido N-terminal).

35 Los tumores que se producen por las células VEGF-D Δ N crecen más rápidamente que los tumores producidos por las células control. En el examen morfológico los tumores eran de color rojo y contenían una reacción vascular significativa, incluyendo un componente líquido sustancial que no se vio en los tumores de control. Los tumores producidos por las células VEGF-D Δ N tenían diferencias significativas en cuanto al crecimiento y las características morfológicas respecto a los tumores controles.

40 El gráfico de la Figura 11 muestra el aumento de la velocidad de crecimiento de los tumores procedentes de células VEGF-D Δ N. La tendencia a la acumulación de líquido en los tumores producidos por las células VEGF-D Δ N se puede observar en la Figura 12, que es una fotografía de un tumor de este tipo. Esto se puede comparar con la fotografía de la Figura 13, que representa un tumor normal como el que está producido por las células control.

Los tumores producidos por las células VEGF-D Δ C crecieron de una manera similar a los producidos por las células controles y no mostraron una formación excesiva de líquido.

45 Los tumores producidos por las células VEGF-D Δ N Δ C crecieron muy lentamente en comparación con los tumores

controles. Los tumores VEGF-D Δ N Δ C se formaron en aproximadamente 70 días, en comparación con un promedio de 30-35 días para los tumores controles y de 20-25 días para los tumores VEGF-D Δ N. El examen de estos tumores mostró que tenían una menor respuesta vascular, y tenían menos vasos sanguíneos que los tumores de acuerdo con la tinción con PECAM-1. Los tumores desarrollaron redes linfáticas, como se muestra con la tinción con LYVE-1, e indujeron la formación de metástasis linfáticas. El gráfico de la Figura 14 muestra la velocidad de crecimiento disminuida de los tumores procedentes de células VEGF-D Δ N Δ C.

La localización de VEGF-D en el melanoma maligno es coherente con una función para esta molécula en la angiogénesis tumoral ya que se detectaron señales fuertes para VEGF-D en las células endoteliales de los vasos sanguíneos cercanos a las células tumorales inmunopositivas, pero no en los vasos alejados de las células tumorales. Esto indica que el VEGF-D encontrado en los vasos en o cerca del tumor puede surgir debido a la captación mediada por el receptor, lo que apoya la hipótesis de que el VEGF-D, secretado por las células tumorales, se une y se acumula en las células endoteliales diana estableciendo de esta manera un mecanismo paracrino que regula la angiogénesis tumoral. Previamente se ha indicado un patrón similar de localización de VEGF en células tumorales y en vasos sanguíneos tumorales (Plate, K. y col., *Brain Pathology* **4**: 207-218, 1994). Coherente con la hipótesis de que VEGF-D participa en la angiogénesis tumoral es el hallazgo de que un receptor para VEGF-D, VEGFR-2, se regula positivamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos en los tumores (Plate, K. y col., *Cancer Res* **53**: 5822-5827, 1993). De hecho, algunos de los vasos inmunopositivos de VEGF-D detectados en los melanomas estudiados aquí también fueron positivos para VEGFR-2. La señalización a través de VEGFR-2 es importante para sostener la angiogénesis tumoral (Millauer, B. y col., *Cancer Res* **56**: 1615-1620, 1996) y la actividad angiogénica de VEGF-D *in vivo* (Marconcini, L. y col., *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9671-9676, 1999) está mediada más probablemente por este receptor. En el carcinoma de células escamosas de pulmón y en el carcinoma ductal de mama *in situ* (BDCIS) se observaron patrones de tinción similares a los que se observan en los melanomas, porque se detectó VEGF-D en las células tumorales y en los vasos adyacentes. Los vasos próximos a los conductos llenos de tumor en el BDCIS y cerca de los islotes de células tumorales en el carcinoma de pulmón también eran positivos a VEGFR-2, lo que una vez más indica que este ligando y su receptor pueden contribuir al control de la angiogénesis tumoral de manera paracrina.

Estos resultados también indican que VEGF-D puede participar en la estimulación del crecimiento de los vasos linfáticos que están en la proximidad del melanoma maligno, porque los vasos positivos para VEGFR-3, que es un receptor de VEGF-D que se expresa en el endotelio linfático de los tejidos adultos normales, también eran positivos para VEGF-D. Se observaron patrones de tinción similares en el BDCIS, porque algunos de los vasos positivos para VEGF-D que rodeaban a los conductos rellenos de tumor también eran positivos para VEGFR-3. Se piensa que la señalización a través de VEGFR-3 es importante para la linfangiogénesis (Taipale y col., *Curr Top Microbiol Immunol.*, **237**: 85-96, 1999), aunque este receptor puede estar activado en los capilares vasculares sanguíneos en el cáncer (Valtola, R., y col., *Am. J. Path.*, **154**: 1381-1390, 1999). Por lo tanto, el sistema regulador paracrino formado por VEGF-D y VEGFR-3 podría estimular tanto la linfangiogénesis como la angiogénesis en el cáncer. Por consiguiente, la ruta de diseminación metastásica de un tumor puede estar determinada en parte por su capacidad de inducir angiogénesis y linfangiogénesis. Si es así, la expresión por las células tumorales de factores de crecimiento solubles que son puramente angiogénicos (por ejemplo, VEGF) en contraposición a los que también pueden inducir linfangiogénesis (por ejemplo, VEGF-D) podría ser un determinante importante de la ruta de diseminación metastásica.

El VEGF-D también puede participar en el mantenimiento vascular en tejidos no tumorigénicos. En las arteriolas de la submucosa del colon, el VEGF-D se localizó en el músculo liso vascular, no en el endotelio. La ausencia de VEGF-D en el endotelio es probablemente una consecuencia de la falta de expresión de VEGFR-2 y VEGFR-3 de los receptores de VEGF-D en las células endoteliales. La activación del endotelio en respuesta a una lesión vascular es probablemente suficiente para inducir la expresión de VEGFR-2 por las células endoteliales (Issa, R. y col., *Invest.* **79**: 417-425, 1999) lo que, a su vez, convierte al VEGF-D, producido por el músculo liso vascular, en capaz de inducir la proliferación de células endoteliales y afectar de este modo a la reparación de los vasos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cribar una enfermedad neoplásica seleccionada entre carcinoma ductal de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata y cáncer de endometrio, que comprende:
 - 5 i) exponer una muestra de tejido obtenida de un organismo del que se sospecha que está en dicho estado de enfermedad neoplásica a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio de homología de VEGF de VEGF-D;
 - ii) lavar dicha muestra de tejido; y
 - 10 iii) cribar dicha enfermedad detectando la presencia, cantidad o distribución de dicho anticuerpo monoclonal en dicha muestra de tejido, en la que la detección de VEGF-D en o sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos o las células endoteliales linfáticas en o alrededor de un crecimiento neoplásico potencial indica la enfermedad neoplásica.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de la etapa (iii) son células endoteliales de vasos sanguíneos.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende adicionalmente exponer la muestra de tejido a un segundo compuesto que se une específicamente a al menos uno de VEGFR-2 y VEGFR-3, y en el que la etapa de cribado comprende la detección del anticuerpo monoclonal que se une al dominio de homología de VEGF de VEGF-D y el segundo compuesto unido a células endoteliales vasculares de los vasos sanguíneos, para determinar la presencia, cantidad o distribución de las células endoteliales de los vasos sanguíneos que tienen tanto VEGF-D como al menos uno de VEGFR-2 y VEGFR-3 en o alrededor de un crecimiento neoplásico potencial.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de la etapa (iii) son células endoteliales de los vasos linfáticos.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente exponer la muestra de tejido a un segundo compuesto que se une específicamente a VEGFR-3, y en el que la etapa de cribado comprende la detección del anticuerpo monoclonal que se une al dominio de homología de VEGF de VEGF-D y el segundo compuesto unido a células endoteliales de los vasos linfáticos,
 - 25 para determinar la presencia, cantidad o distribución de las células endoteliales de los vasos linfáticos que tienen tanto VEGF-D como VEGFR-3 en o alrededor de un crecimiento neoplásico potencial.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de tejido aislada de la etapa (i) es una muestra de tumor y el riesgo de metástasis de la muestra de tumor se determina en la etapa (iii).
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se detecta micro-metástasis de la enfermedad neoplásica y en el que la muestra de tejido aislada de la etapa (i) se obtiene de un sitio separado de un crecimiento neoplásico del organismo.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha muestra de tejido es un ganglio linfático del tejido que rodea dicho crecimiento neoplásico.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho anticuerpo monoclonal incluye un marcador detectable.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha muestra de tejido es una muestra de tejido humano.

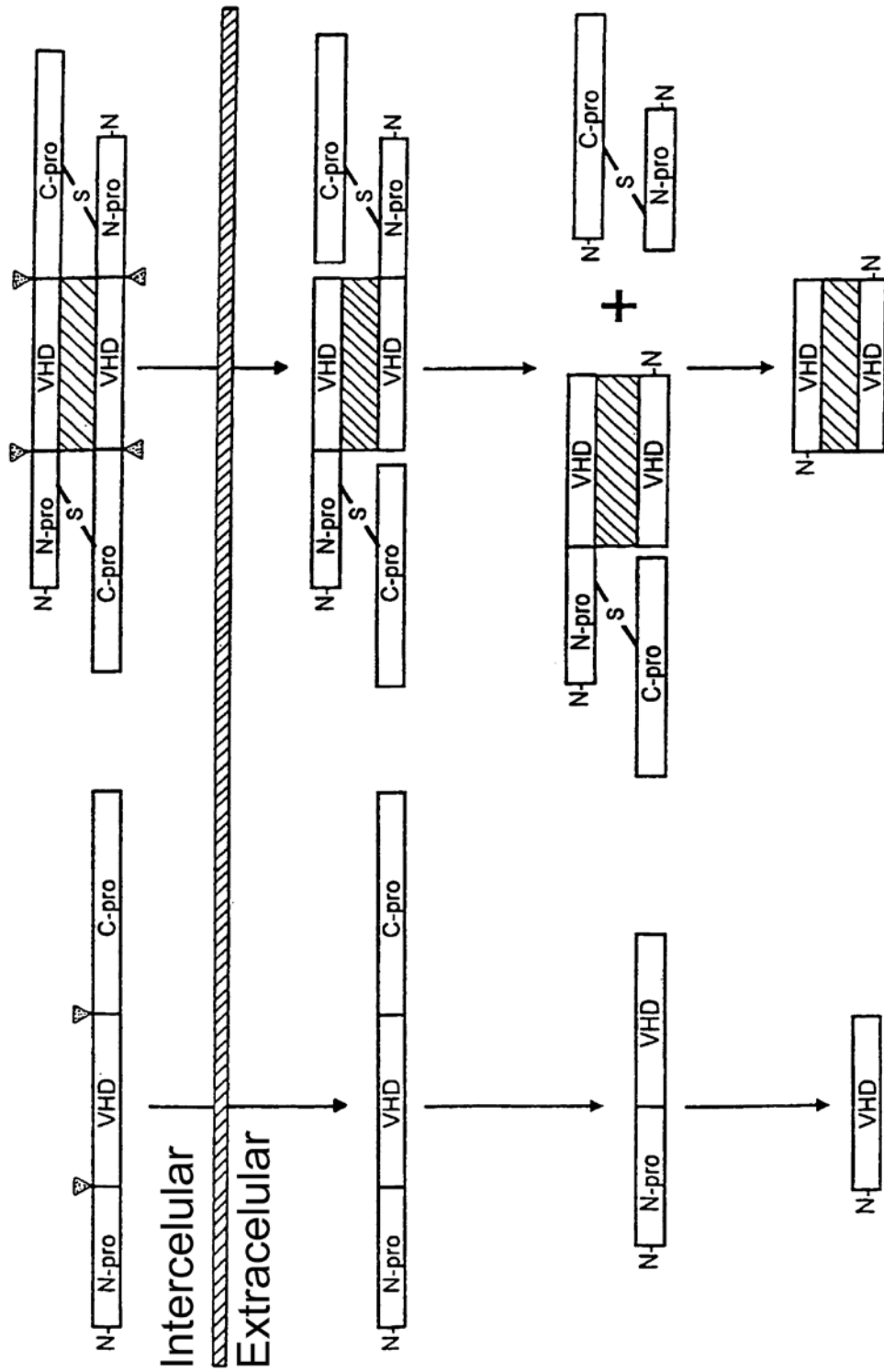


FIG. 1

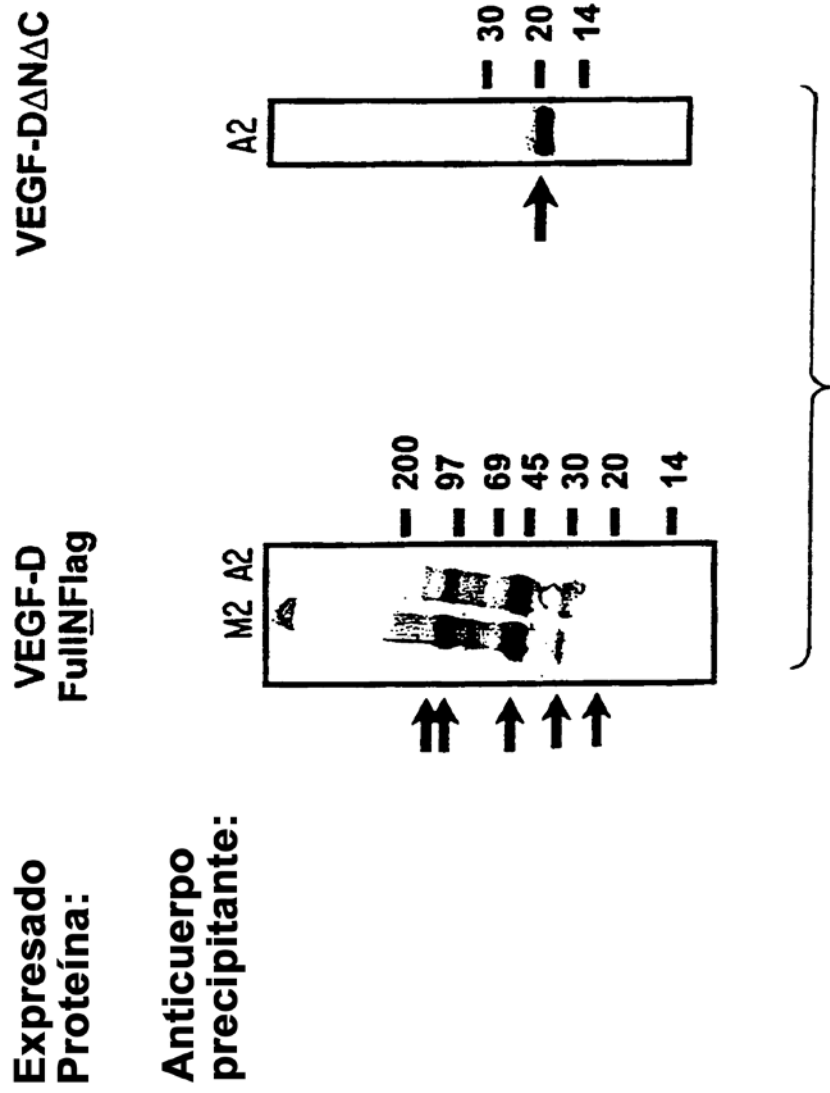
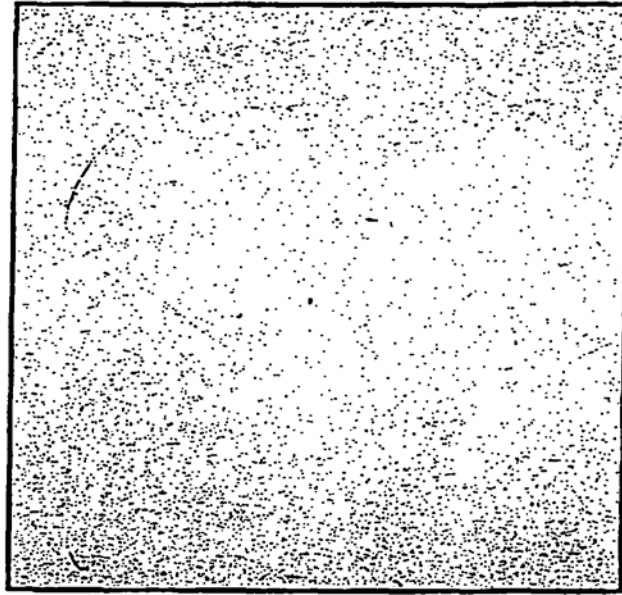


FIG. 2

VEGF-D codificante



VEGF-D no codificante

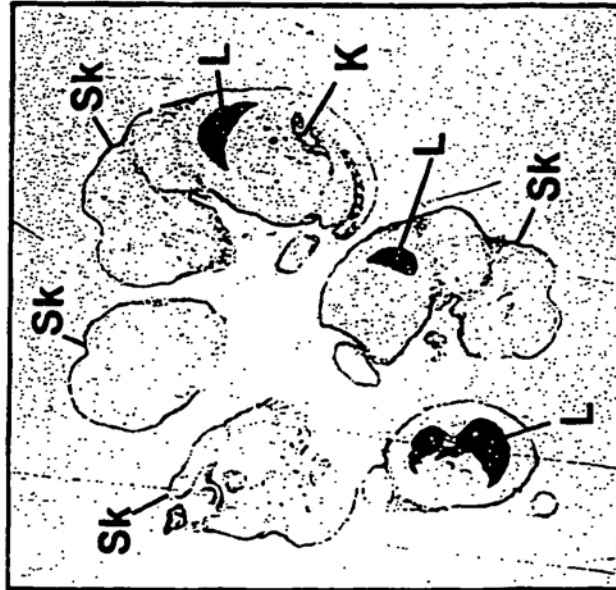


FIG. 3

FIG. 4B

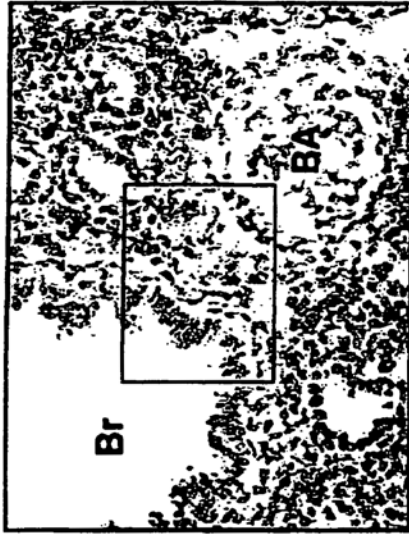


FIG. 4A



FIG. 4D

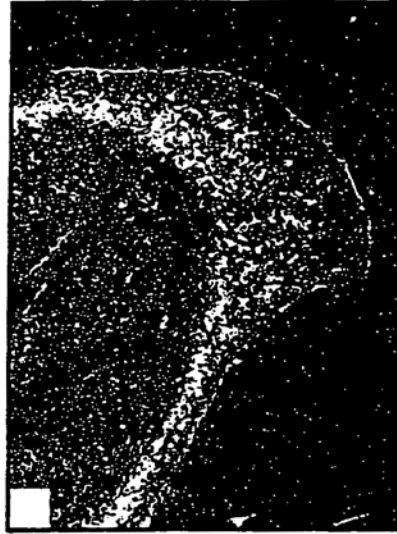


FIG. 4C



FIG. 5B



FIG. 5A



FIG. 5D



FIG. 5C



FIG. 5G



FIG. 5E

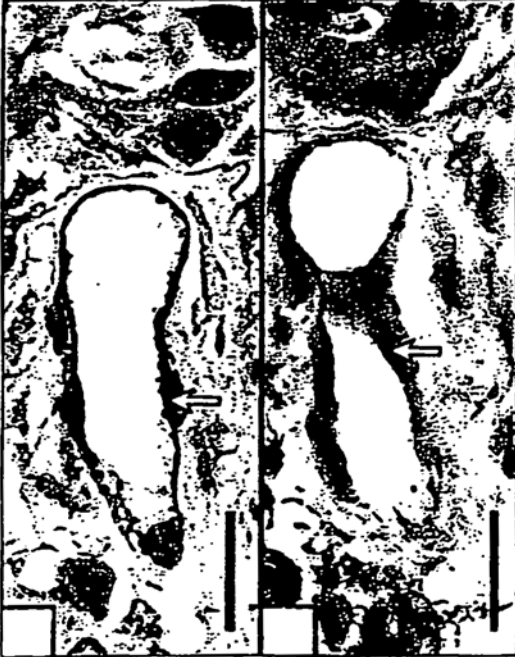


FIG. 5H

FIG. 5F

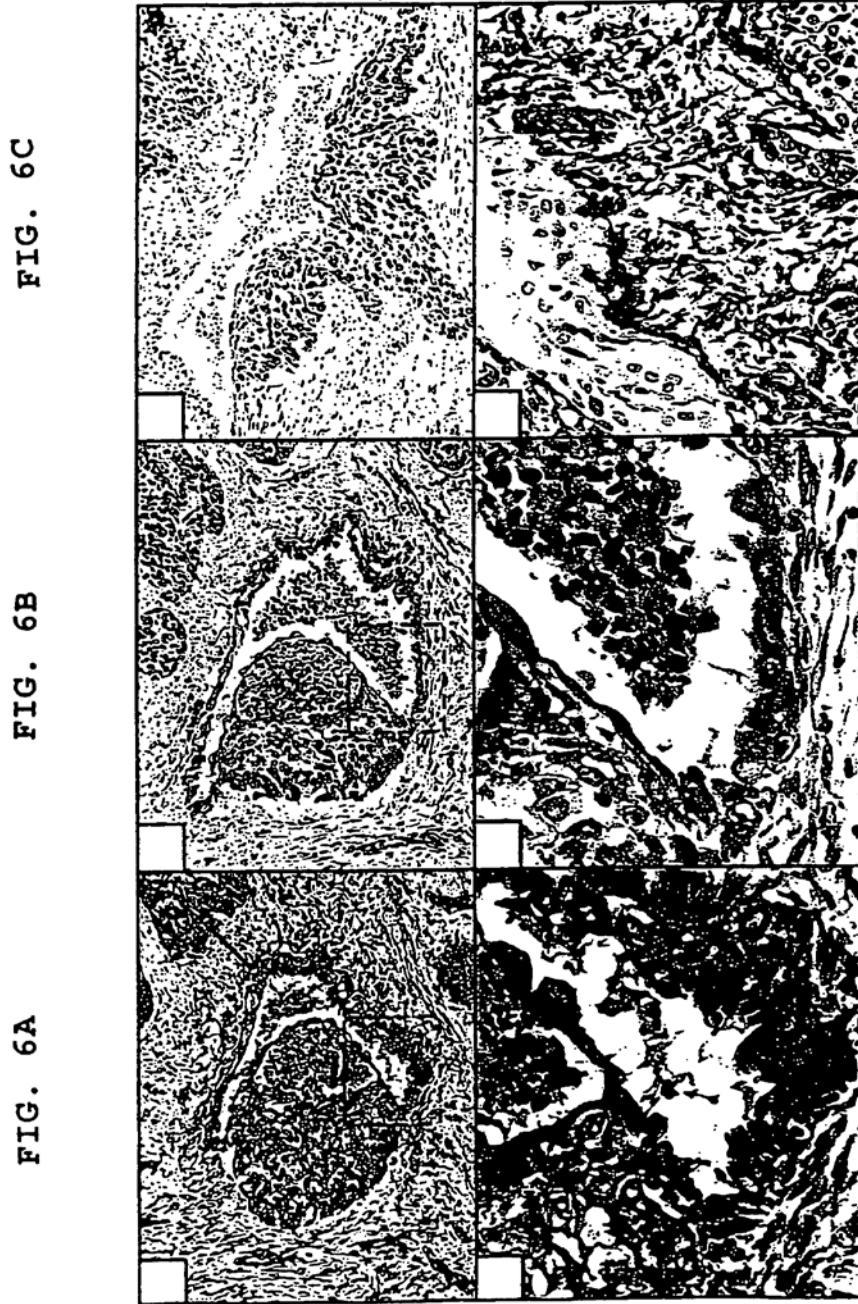


FIG. 6C

FIG. 6B

FIG. 6A

FIG. 6F

FIG. 6E

FIG. 6D

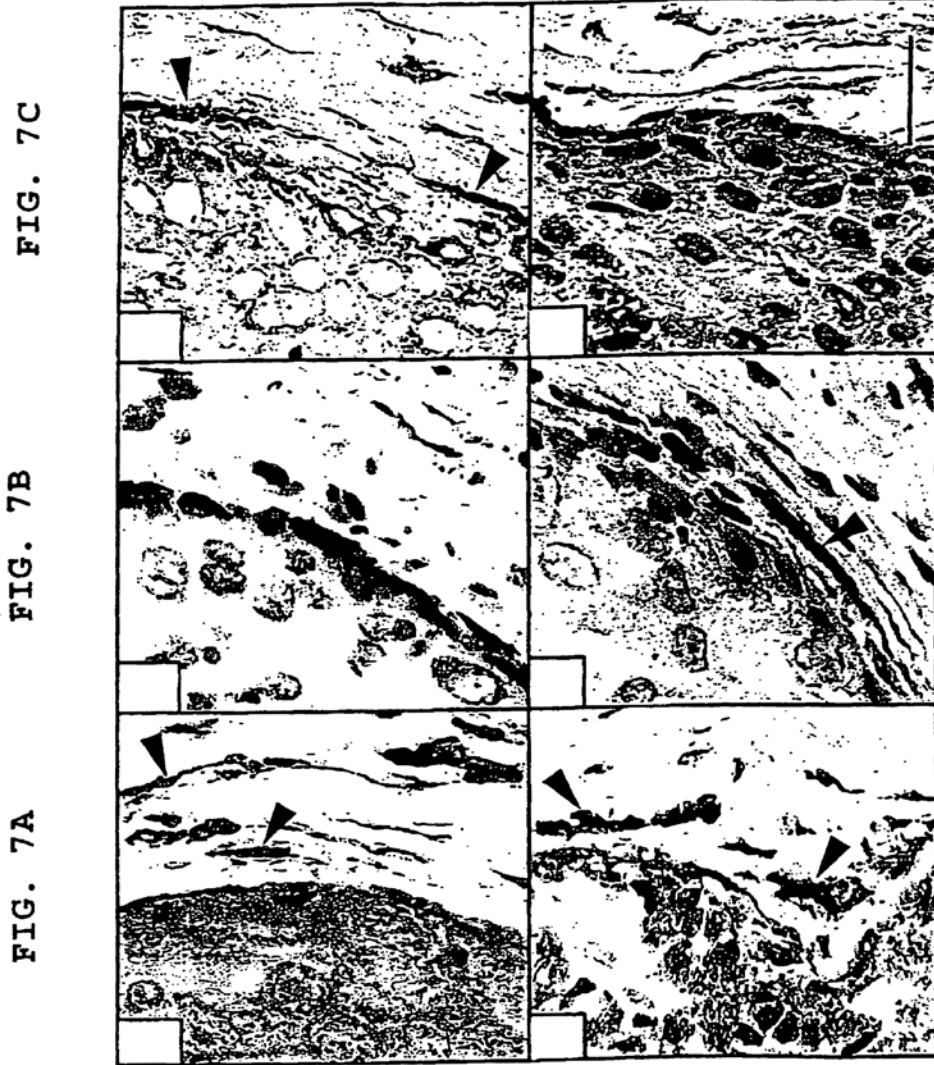


FIG. 7A

FIG. 7B

FIG. 7C

FIG. 7D

FIG. 7E

FIG. 7F



FIG. 8

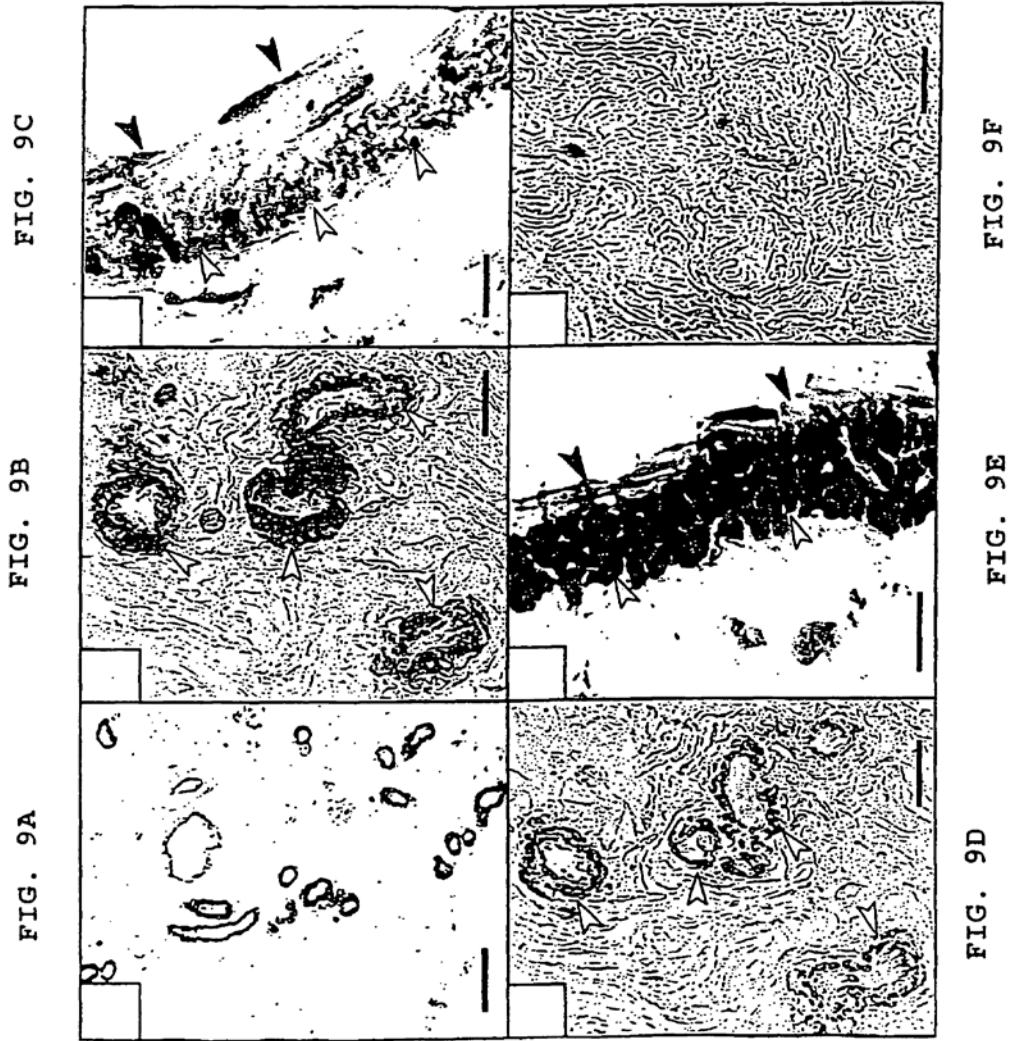


FIG. 9C

FIG. 9B

FIG. 9A

FIG. 9F

FIG. 9E

FIG. 9D

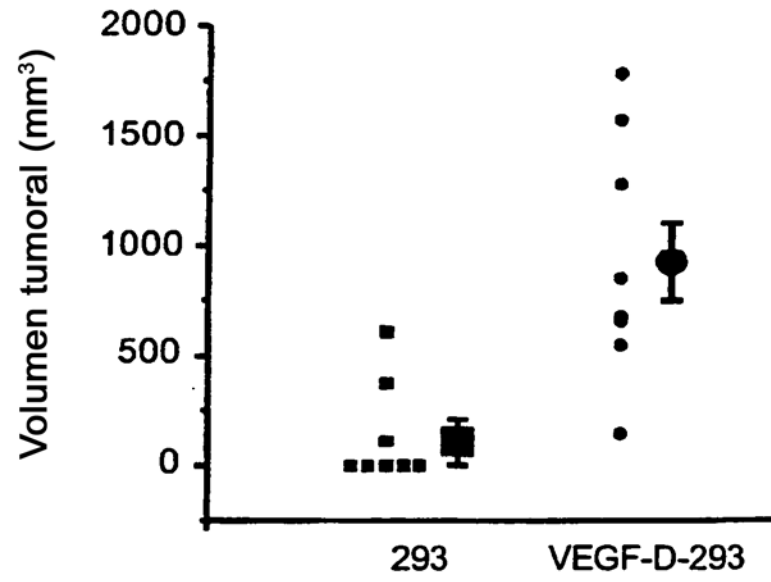


FIG. 10

Figura 11

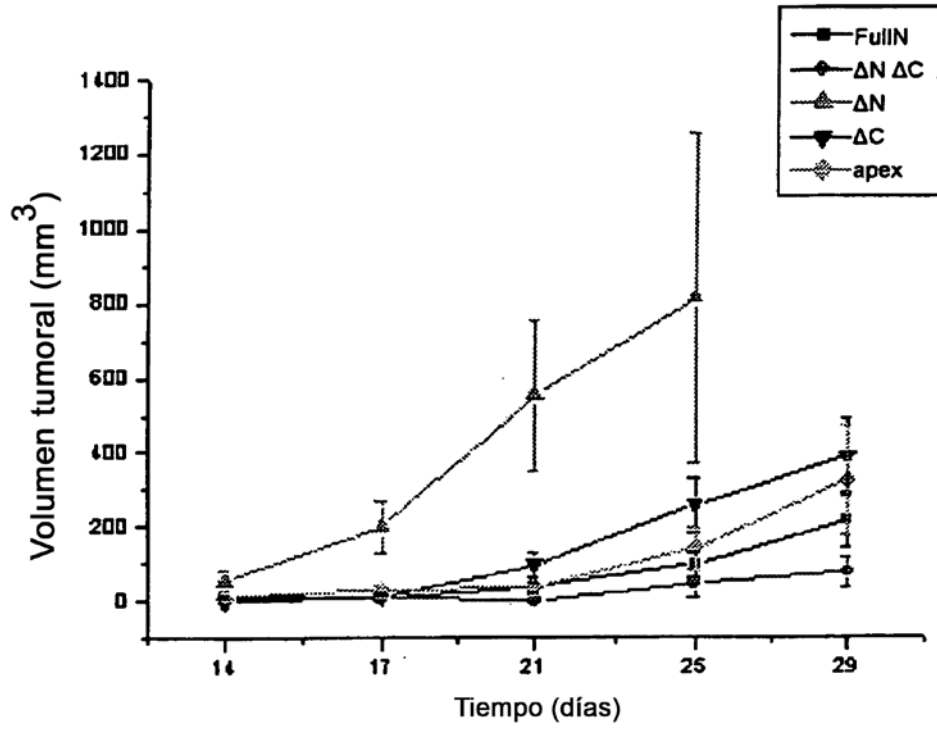


Figura 12



Figura 13



Figura 14

