

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 387**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07K 14/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08012659 .2**  
96 Fecha de presentación: **10.03.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2016951**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **Polipéptidos homólogos de VEGF y de BMP1**

30 Prioridad:  
**17.03.1998 US 40220**  
**02.11.1998 US 184216**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.10.2012**

73 Titular/es:  
**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:  
**FERRARA, NAPOLEONE y**  
**KUO, SOPHIA, S.**

74 Agente/Representante:  
**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 389 387 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

**Campo de la invención**

5 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos relacionados con el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (en lo sucesivo ocasionalmente denominado VEGF) y proteína morfogenética ósea 1 (en lo sucesivo ocasionalmente denominada BMP1), denominados en la presente invención polipéptidos VEGF-E, ácidos nucleicos codificantes de los mismos, procedimientos para preparar VEGF-E y procedimientos, composiciones y ensayos que utilizan VEGF-E.

**Antecedentes de la invención**

10 [0002] Diversos polipéptidos de origen natural se ha informado de que inducen la proliferación de células endoteliales. Entre estos polipéptidos se encuentran los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) básicos y ácidos (Burgess y Maciag, Annual Rev. Biochem. 58:575, 1989), factor de crecimiento de células endoteliales derivadas de plaquetas (PD-ECGF) (Ishikawa *et al.*, Nature 338:557, 1989) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Leung *et al.*, Science 246:1306, 1989; Ferrara y Henzel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851, 1989; Tischer *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 165:1198, 1989; patente EP nº 471.754B concedida el 31 de julio de 1996.

15 [0003] El factor de crecimiento de células endoteliales ligante de heparina, VEGF, se identificó y se purificó a partir de medio condicionado con células foliculares pituitarias bovinas o foliculo-estrelladas hace varios años (ver Ferrara *et al.*, Biophys. Res. Comm. 161:851, 1989). Los medios condicionados por células transfectadas con ADNc de VEGF humano (VEGFh) estimularon la proliferación de células endoteliales capilares, mientras que las células de control no presentaron este efecto (Leung *et al.*, Science 246:1306, 1989). VEGF es un compuesto de origen natural producido en las células foliculares o foliculo-estrelladas (FC), una población morfológicamente bien caracterizada de células granulares. Las FC son células estrelladas que envían procesos citoplasmáticos entre células secretorias.

20 [0004] VEGF se expresa en una diversidad de tejidos en forma de múltiples isoformas homodiméricas (121, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero), también denominadas colectivamente proteínas de tipo VEGFh, resultantes del procesamiento alternativo del ARN. La proteína de 121 aminoácidos difiere de VEGFh por la delección de los 44 aminoácidos entre los residuos 116 y 159 en VEGFh. La proteína de 189 aminoácidos difiere de VEGFh por la inserción de 24 aminoácidos en el residuo 116 en VEGFh y aparentemente es idéntica al factor de permeabilidad vascular humano (VPFh). La proteína de 206 aminoácidos difiere de VEGFh por la inserción de 41 aminoácidos en el residuo 116 en VEGFh (Houck *et al.*, Mol. Endocrin. 5:1806, 1991; Ferrara *et al.*, J. Cell. Biochem. 47:211, 1991; Ferrara *et al.*, Endocrine Reviews 13:18, 1992; Keck *et al.*, Science 246:1309, 1989; Connolly *et al.*, J. Biol. Chem. 264:20017, 1989; patente EP nº 370.989, publicada el 30 de mayo de 1990. VEGF121 es un mitógeno soluble que no se une a heparina; las formas más largas de VEGF se unen a la heparina con afinidad progresivamente más elevada. Las formas ligantes de heparina de VEGF pueden ser cortadas en el péptido carboxi-terminal por la plasmina, liberando: (a) una o más formas difusibles de VEGF. La secuencia de aminoácidos del péptido carboxi-terminal identificado tras el corte con plasmina es Arg110-Ala111. La proteína "nuclear" aminoterminal, VEGF(1-110), aislada en forma de homodímero, se une a anticuerpos monoclonales neutralizantes (4.6.1 y 2E3) y a formas solubles de tirosina quinasa de tipo FMS (FLT-1), a receptores de región de dominio quinasa (KDR) y de quinasa hepática fetal (FLK) con afinidad similar al homodímero VEGF165 intacto.

35 [0005] Tal como se ha indicado, VEGF contiene dos dominios responsables, respectivamente, de la unión a los receptores KDF y FLT-1. Estos receptores únicamente existen sobre las células endoteliales (vasculares). A media que las células agotan el oxígeno, debido a traumatismos y similares, se incrementa la producción de VEGF en estas células, que después se unen a los receptores respectivos con el fin de señalizar un efecto biológico final. Seguidamente, la señal incrementa la permeabilidad vascular y las células se dividen y se expanden formando nuevas rutas vasculares: vasculogénesis y angiogénesis.

40 [0006] De esta manera, VEGF resulta útil para tratar condiciones en las que resulta importante una acción seleccionada sobre las células endoteliales vasculares, en ausencia de crecimiento excesivo de tejido, por ejemplo en úlceras diabéticas y en lesiones vasculares resultantes de traumatismo, tales como las heridas subcutáneas. Al ser un factor de crecimiento celular endotelial vascular (arterial y venoso), VEGF restaura las células dañadas, un proceso denominado vasculogénesis, y estimular la formación de nuevos vasos, un proceso denominado angiogénesis.

45 [0007] VEGF también resultaría útil en la restauración de la vasculatura tras un infarto de miocardio, así como en otros usos que pueden deducirse. A este respecto, en ocasiones resultan deseables los inhibidores del VEGF, particularmente para mitigar procesos tales como la angiogénesis y la vasculogénesis en células cancerosas.

50 [0008] En la actualidad está bien establecido que la angiogénesis, que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente, se encuentra implicado en la patogénesis de una diversidad de trastornos. Entre estos se incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolenta, hemangiomas, inflamación crónica, síndromes neovasculares intraoculares, tales como retinopatías proliferativas, por ejemplo la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), el glaucoma neovascular, el rechazo inmunológico del tejido corneal trasplantado y de otros tejidos, la artritis reumatoide y la soriasis (Folkman *et al.*, J.

Biol. Chem. 267:10931-10934, 1992; Klagsbrun *et al.*, Annu. Rev. Physiol. 53:217-239, 1991, y Garner A., "Vascular diseases", en: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, editores, 2a edición (Marcel Dekker, NY, 1994), páginas 1625 a 1710.

5 **[0009]** En el caso del crecimiento tumoral, la angiogénesis aparentemente resulta crucial para la transición de la hiperplasia a la neoplasia, y para proporcionar alimento al tumor sólido en crecimiento (Folkman *et al.*, Nature 339:58, 1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y de autonomía proliferativa sobre las células normales. Por consiguiente, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones de tumor y la supervivencia del paciente en el cáncer de mama, así como en varios otros tumores (Weidner *et al.*, N. Engl. J. Med. 324:1-6, 1991; Horak *et al.*, Lancet 340:1120-1124, 1992; Macchiarini *et al.*, Lancet 340:145-146, 1992).

10 **[0010]** La búsqueda de reguladores positivos de la angiogénesis ha proporcionado muchos candidatos, incluyendo FGFa, FGFb, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, TNF- $\alpha$ , angiogenina, IL-8, etc. (Folkman *et al.*, J.B.C., *supra*, y Klagsbrun *et al.*, *supra*). Entre los reguladores negativos identificados hasta el momento se incluyen la trombospondina (Good *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6624-6628, 1990), el fragmento N-terminal de 16 kilodaltons de la prolactina (Clapp *et al.*, Endocrinology 133:1292-1299, 1993), la angiostatina (O'Reilly *et al.*, Cell 79:315-328, 1994) y la endostatina (O'Reilly *et al.*, Cell 88:277-285, 1996). Los trabajos realizados en los últimos años han establecido el papel clave del VEGF, no sólo en la estimulación de la proliferación de células endoteliales vasculares, sino también en la inducción de la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Ferrara *et al.*, Endocr. Rev. 18:4-25, 1997). El resultado de que la pérdida de incluso un sólo alelo de VEGF resulta en letalidad embrionaria apunta a un papel irremplazable de este factor en el desarrollo y la diferenciación del sistema vascular. Además, se ha demostrado que VEGF es un mediador clave en la neovascularización asociada a tumores y a trastornos intraoculares (Ferrara *et al.*, Endocr. Rev., *supra*). El ARNm de VEGF se sobreexpresa en la mayoría de los tumores humanos examinados (Berkman *et al.*, J. Clin. Invest. 91:153-159, 1993; Brown *et al.*, Human Pathol. 26:86-91, 1995; Brown *et al.*, Cancer Res. 53:4727-4735, 1993; Mattern *et al.*, Brit. J. Cancer 73:931-934, 1996; Dvorak *et al.*, Am. J. Pathol. 146:1029-1039, 1995).

25 **[0011]** Además, las concentraciones de VEGF en los líquidos oculares se encuentran altamente correlacionados con la presencia de proliferación activa de los vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras retinopatía relacionadas con isquemia (Aiello *et al.*, N. Engl. J. Med. 331:1480-1487, 1994). Además, estudios recientes han demostrado la localización del EGF en membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados por ADM (Lopez *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:844-868, 1996). Los anticuerpos neutralizadores anti-VEGF suprimen el crecimiento de una diversidad de líneas celulares tumorales humanas en ratones desnudos (Kim *et al.*, Nature 362:841-844, 1993; Warren *et al.*, J. Clin. Invest. 95:1789-1797, 1995; Borgström *et al.*, Cancer Res. 56:4032-4039, 1996; Melnyk *et al.*, Cancer Res. 56:921-924, 1996) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinianos isquémicos (Adams *et al.*, Arch. Ophthalmol. 114:66-71, 1996). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción de VEGF son candidatos prometedores para el tratamiento de tumores sólidos y de diversos trastornos neovasculares intraoculares. Estos anticuerpos se describen, por ejemplo, en la patente EP nº 817.648, publicada el 14 de enero de 1998, y en la patente PCT nº US 98/06724, presentada el 3 de abril de 1998.

40 **[0012]** Respecto a la familia de proteínas morfogenéticas óseas, se ha informado de que miembros de esta familia se encuentran implicados en la diferenciación del cartílago y en la estimulación de la vascularización y de la osteoinducción en hidroxiapatito preformado (Zou *et al.*, Genes Dev. (U.S.) 11(17):2191, 1997; Levine *et al.*, Ann. Plast. Surg. 39(2):158, 1997). Se han identificado varias proteínas morfogenéticas óseas relacionadas, la totalidad de las cuales son miembros de la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP). Las proteínas morfogenéticas óseas nativas y mutantes, los ácidos nucleicos codificantes de las mismas, los compuestos relacionados, incluyendo receptores, las células huésped, y los usos se describen adicionalmente en, como mínimo, las patentes US nº 5.670.338, nº 5.454.419, nº 5.661.007, nº 5.637.480, nº 5.631.142, nº 5.166.058, nº 5.620.867, nº 5.543.394, nº 4.877.864, nº 5.013.649, nº 5.106.748 y nº 5.399.677. Resultan de interés particular las proteínas que presentan homología con la proteína morfogenética ósea 1, una proteinasa C del procolágeno que desempeña papeles clave en la regulación de la deposición de la matriz. En vista del papel del crecimiento celular endotelial vascular y la angiogénesis en muchas enfermedades y trastornos, resulta deseable disponer de un medio para reducir o inhibir uno o más de los efectos biológicos que causan estos procesos. También resulta deseable disponer de un medio para someter a ensayo la presencia de polipéptidos patogénicos en condiciones normales y de enfermedad, y especialmente en el cáncer. Además, en un aspecto específico, debido a que no existe una terapia de aplicación general para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca, la identificación de factores que pueden prevenir o reducir la hipertrofia de los miocitos cardíacos resulta de importancia fundamental en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la inhibición del crecimiento cardíaco fisiopatológico. Aunque existen varias modalidades de tratamiento para diversos trastornos cardiovasculares y oncológicos, todavía existe una necesidad de enfoques terapéuticos adicionales.

60 **[0013]** La presente invención se basa en investigación destinada a identificar nuevos polipéptidos relacionados con la familia de VEGF y de BMP, y en particular a polipéptidos que presentan un papel en la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de las células. Aunque no se espera que los nuevos polipéptidos presenten actividad biológica idéntica a los polipéptidos conocidos con los que presentan homología, las actividades biológicas de los polipéptidos conocidos pueden utilizarse para determinar las actividades biológicas relativas de los nuevos polipéptidos. En

particular, los nuevos polipéptidos descritos en la presente invención pueden utilizarse en ensayos destinados a determinar la capacidad de un polipéptido de inducir la supervivencia, la proliferación o la diferenciación de las células. A su vez, los resultados de estos ensayos pueden utilizarse consiguientemente con fines diagnósticos y terapéuticos. Los resultados de dicha investigación son el objetivo de la presente invención.

## 5 Descripción resumida de la invención

**[0014]** Tal y como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona anticuerpos antagonistas anti-VEGF; y otros agentes para utilizar en el procedimiento de tratamiento del cáncer mediante la administración en serio o en combinación.

**[0015]** La invención también proporciona usos relacionados, también tal y como se definen en las reivindicaciones.

## 10 Breve descripción de los dibujos

**[0016]** La figura 1 ilustra una secuencia de ADN de longitud completa de VEGF-E (SEC ID nº 1), la región codificante de la cual está comprendida entre los residuos nucleótidos 259 y 1.293. La SEC ID nº 1 representa el DNA:29101 depositado como DNA29101-1276 el 5 de marzo de 1998 en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Es la secuencia DNA:29101, también denominada UNQ:174 en la presente invención, que contiene la región codificante de VEGF-E. El codón de inicio y de parada están señalados con un círculo, mostrando la región codificante que se inicia con ATG y el codón de parada inmediatamente después del último nucleótido codificante. La región codificante, de 1.035 nucleótidos de longitud, se encuentra comprendida dentro de la secuencia SEC ID nº 1, en las posiciones 259 a 1.293. La secuencia SEC ID nº 1 incluye el ácido nucleico codificante de la secuencia de señal líder supuesta o la preproteína, y la proteína madura putativa.

20 La figura 2 ilustra la secuencia de aminoácidos deducida de VEGF-E, también denominada en la presente invención PRO:200, SEC ID nº 2. Esta secuencia representa la proteína codificada por el marco de lectura abierto de UNQ:174. El peso molecular correspondiente es 39.029 D. El pI es 6,06. El NX(S/T) es 3. Los sitios potenciales de N-glucosilación se encuentran en las posiciones 25, 54 y 254. Los dominios CUB se encuentran en las posiciones 52 a 65, 118 a 125 y 260 a 273.

25 Las figuras 3A a 3H muestran el efecto de ningún factor de crecimiento (fig. 3A) y de uno o más factores de crecimiento (VEGF, FGFb y/o PMA) (figs. 11B a 11H) sobre la formación del tubo de HUVEC. La figura 3B muestra VEGF, FGFb y PMA combinados, la fig. 3C muestra VEGF y FGFb combinados; la fig. 3D muestra VEGF y PMA combinados; la fig. 3E muestra FGFb y PMA combinados; la fig. 3F muestra VEGF solo; la fig. 3G muestra FGFb solo, y la fig. 3H muestra PMA solo.

30 Las figuras 4A y 4B muestran, respectivamente, el efecto sobre la formación del tubo de HUVEC de VEGF-E conjugado con IgG a una dilución del 1% y de un control de tampón (HEPES 10 mM/NaCl 0,14 M/manitol al 4%, pH 6,8) a una dilución del 1%.

35 Las figuras 5A y 5B muestran, respectivamente, el efecto sobre la formación del tubo de HUEV de VEGF-E conjugado con poli-his a una dilución del 1% y de un control de tampón (igual que en la fig. 4B) a una dilución del 1%.

## Descripción detallada de la invención

### I. Definiciones

40 **[0017]** Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "factor E de crecimiento celular endotelial vascular" o "VEGF-E" se refiere a un factor de crecimiento de mamífero tal como se describe en la presente invención, incluyendo la secuencia de aminoácidos humana de la figura 2, una secuencia que presenta homología con VEGF y la proteína morfogenética ósea 1 y que incluye la conservación completa de todos los residuos de cisteína de VEGF, que se ha demostrado que resultan necesarios para la actividad biológica del VEGF. La expresión de VEGF-E incluye la expresión en hueso fetal humano, timo y tracto gastrointestinal, así como en testículos fetales y nódulos linfáticos, y en otros tejidos, tal como se muestra en los ejemplos posteriormente. La actividad biológica del VEGF-E  
45 nativo se encuentra compartida con cualquier análogo o variante del mismo que estimula el crecimiento selectivo y/o la supervivencia de las células endoteliales de la vena umbilical, induce la proliferación de células fibroblásticas pluripotentes, induce el gen c-fos temprano inmediato en las líneas celulares endoteliales humanas, causa la hipertrofia de los miocitos en las células cardíacas, inhibe la proliferación estimulada por VEGF de las células endoteliales capilares corticales adrenales, o que posee un epítipo inmune que presenta reactividad cruzada  
50 inmunológica con un anticuerpo cultivado contra por lo menos un epítipo del VEGF nativo correspondiente. El VEGF-E humano de la presente invención es activo en células de rata y de ratón, indicando la conservación en diferentes especies. Además, el VEGF-E de la presente invención se expresa en la región de la placa de crecimiento y se ha demostrado que comprende los miocitos fetales.

55 **[0018]** Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "factor de crecimiento celular endotelial vascular" o "VEGF" se refiere a un factor de crecimiento de mamífero tal como se define en la patente US nº 5.332.671. La

actividad biológica del VEGF nativo está compartida por cualquier análogo o variante del mismo que estimule el crecimiento selectivo de las células endoteliales vasculares pero no de las células endoteliales corneales bovinas, células epiteliales de la lente, células del córtex adrenal, fibroblastos BHK-21 o queratinocitos, o que posee un epítipo inmunológico que presenta reactividad inmunológica cruzada con un anticuerpo cultivado contra por lo menos un epítipo del VEGF nativo correspondiente.

**[0019]** Las expresiones “polipéptido VEGF-E” y “VEGF-E” tal como se utilizan en la presente invención comprenden polipéptido VEGF de secuencia nativa y variantes de polipéptido VEGF-E (que se definen adicionalmente en la presente invención). Los polipéptidos VEGF-E pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, tales como los tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por medios recombinantes o sintéticos.

**[0020]** La expresión “polipéptido VEGF-E de secuencia nativa” comprende un polipéptido que presenta la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido VEGF-E derivado de la naturaleza. Este polipéptido VEGF-E de secuencia nativa puede aislarse a partir de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. La expresión “polipéptido VEGF-E de secuencia nativa” específicamente comprende formas truncadas o secretadas de origen natural de un polipéptido VEGF-E, formas variantes de origen natural (por ejemplo formas alternativamente procesadas) y variantes alélicas de origen natural de un polipéptido VEGF-E. En una realización de la invención, el polipéptido VEGF-E de secuencia nativa es un polipéptido VEGF-E de secuencia nativa maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 345, tal como se ilustra en la figura 2.

**[0021]** La expresión “variante de VEGF-E” se refiere a un polipéptido VEGF-E activo tal como se define posteriormente que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80% con el polipéptido VEGF-E que presenta la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 2 para un polipéptido VEGF-E de secuencia nativa de longitud completa. Entre dichas variantes de polipéptido VEGF-E se incluyen, por ejemplo, los polipéptidos VEGF-E en los que se añaden, delecionan o sustituyen uno o más residuos aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de la figura 2 o dentro de la secuencia, así como en fragmentos activos de la misma.

**[0022]** Habitualmente, una variante de polipéptido VEGF-E presentará una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90% y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95% con la secuencia de aminoácidos de la figura 2.

**[0023]** La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de aminoácidos de VEGF-E identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en una secuencia de polipéptido VEGF-E, tras alinear las secuencias e introducir los huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinación del porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro los conocimientos de la técnica, por ejemplo utilizando programas informáticos disponibles públicamente, tales como ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan.

**[0024]** La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos” se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos en la secuencia mostrada en la figura 1 (SEC ID nº 1), respectivamente, tras alinear las secuencias e introducir los huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos puede conseguirse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos de la técnica, por ejemplo utilizando programas informáticos disponibles públicamente, tales como ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan.

**[0025]** El término “aislado” utilizado para describir los diversos polipéptidos dados a conocer en la presente invención, se refiere a un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones no preferentes, el polipéptido se purifica (1) en grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o preferentemente tinción de plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de las células recombinantes, debido a que no se encontrará presente por lo menos un componente del ambiente natural del polipéptido VEGF-E. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

**[0026]** Una molécula “aislada” de ácido nucleico codificante de polipéptido VEGF-E es una molécula de ácido

nucleico que se identifica y se separa a partir de por lo menos una molécula contaminante de ácido nucleico con la que se encuentra habitualmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico codificante del polipéptido VEGF-E. Una molécula de ácido nucleico aislada codificante de polipéptido VEGF-E es diferente de la presente en el contexto anterior en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas aisladas de ácido nucleico codificantes de polipéptido VEGF-E se distinguen de la molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido VEGF-E tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula aislada de ácido nucleico codificante de polipéptido VEGF-E incluye moléculas de ácido nucleico codificante de polipéptido VEGF-E contenidas en células que habitualmente expresan polipéptido VEGF-E en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente que en las células naturales.

**[0027]** Las expresiones “trastorno cardiovascular y endotelial” y “disfunción cardiovascular y endotelial” se utilizan intercambiamente y se refieren a trastornos, típicamente sistémicos, que estimulan la angiogénesis y/o la cardiovascularización. Entre ellos se incluyen enfermedades que afectan los vasos, así como enfermedades de los vasos mismos, tales como las arterias, capilares, venas y/o vasos linfáticos. Entre dichos trastornos se incluyen, por ejemplo, la enfermedad arterial, tal como la aterosclerosis, la hipertensión, la vasculitis inflamatoria, la enfermedad de Reynaud y el fenómeno de Reynaud, aneurismas, y la restenosis arterial; los trastornos venosos y linfáticos, tales como la tromboflebitis, la linfangitis y el linfedema, y otros trastornos vasculares, tales como la enfermedad vascular periférica; los traumatismos, tales como heridas, quemaduras y otras lesiones de los tejidos, fijación de implantes, cicatrización, lesión por isquemia-reperusión, la artritis reumatoide, la enfermedad cerebrovascular; las enfermedades renales, tales como la insuficiencia renal aguda y la osteoporosis. Lo anterior también podría incluir la angina, los infartos de miocardio, tales como los infartos de miocardio agudos, la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca, tal como la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF).

**[0028]** La expresión “trastorno angiogénico” se refiere a un trastorno que requiere tratamiento con un agente que inhibe la angiogénesis, por ejemplo un compuesto angiostático. Entre dichos trastornos se incluyen, por ejemplo, tipos de cáncer, tales como tumores vasculares, por ejemplo el hemangioma (capilar y cavernoso), tumores del glomus, la telangiectasia, la angiomatosis bacilar, el hemangioendotelioma, el angiosarcoma, el hemangiopericitoma, el sarcoma de Kaposi, el linfangioma y el linfagiosarcoma y la angiogénesis tumoral.

**[0029]** El término “hipertrofia” tal como se utiliza en la presente invención, se define como un incremento de masa de un órgano o estructura independiente del crecimiento natural que no implica la formación de tumor. La hipertrofia de un órgano o tejido se debe a un incremento de la masa de las células individuales (hipertrofia verdadera) o a un incremento del número de células que forman el tejido (hiperplasia) o a ambos. Determinados órganos, tales como el corazón, pierden la capacidad de dividirse poco después del nacimiento. Por consiguiente, la “hipertrofia cardíaca” se define como un incremento de la masa del corazón que, en adultos, se caracteriza por un incremento del tamaño de los miocitos y del contenido de proteína contráctil sin división celular concomitante. El carácter del estrés responsable de inducir la hipertrofia (por ejemplo la precarga incrementada, la carga posterior incrementada, la pérdida de miocitos, tal como en el infarto de miocardio, o la depresión primaria de la contractilidad) aparentemente desempeña un papel crítico en la determinación de la naturaleza de la respuesta. El estadio temprano de la hipertrofia cardíaca habitualmente se caracteriza morfológicamente por incrementos del tamaño de las microfibrillas y de las mitocondrias, así como por el agrandamiento de las mitocondrias y de los núcleos. En esta etapa, aunque las células musculares son mayores de lo normal, la organización celular se encuentra en gran parte conservada. En una etapa más avanzada de la hipertrofia cardíaca, se producen incrementos preferentes del tamaño o número de orgánulos específicos, tales como las mitocondrias, y se añaden nuevos elementos contráctiles en áreas localizadas de las células de una manera irregular. Las células que experimentan hipertrofia de larga duración muestran alteraciones más evidentes de la organización celular, incluyendo núcleos marcadamente agrandados con membranas altamente lobuladas, que desplazan las miofibrillas contiguas y causan la degradación del registro normal de bandas Z. La expresión “hipertrofia cardíaca” se utiliza para incluir la totalidad de las etapas de la progresión de esta condición, caracterizada por diversos grados de daño estructural del músculo cardíaco, con independencia del trastorno cardíaco subyacente. Por lo tanto, el término también incluye condiciones fisiológicas necesarias en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, tales como la presión sanguínea elevada, la estenosis aórtica o el infarto de miocardio.

**[0030]** La expresión “insuficiencia cardíaca” se refiere a una anomalía de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre a la tasa necesaria para las necesidades de los tejidos metabolizantes. La insuficiencia cardíaca puede estar causada por varios factores, incluyendo las formas isquémica, congénita, reumática o idiopática.

**[0031]** La expresión “insuficiencia cardíaca congestiva” o “CHF” es un estado patológico progresivo en el que el corazón crecientemente es incapaz de suministrar una salida cardíaca adecuada (volumen de sangre bombeado por el corazón a lo largo de un tiempo) para administrar sangre oxigenada a tejidos periféricos. A medida que progresa la CHF, se producen daños estructurales y hemodinámicos. Aunque estos daños presentan una diversidad de manifestaciones, un síntoma característico es la hipertrofia ventricular. La CHF es un resultado final común en diversos trastornos cardíacos.

**[0032]** El “infarto de miocardio” generalmente resulta de la aterosclerosis de las arterias coronarias, con frecuencia con trombosis coronaria sobreimpuesta. Puede dividirse en dos tipos principales: los infartos transmurales, en los que la necrosis del miocardio implica el grosor completo de la pared ventricular, y los infartos subendocárdicos (no

transmurales), en los que la necrosis implica el subendocardio, el miocardio intramural, o ambos, sin extenderse la totalidad del grosor de la pared ventricular hasta el epicardio. Es conocido que el infarto de miocardio causa tanto un cambio de efectos hemodinámicos como una alteración de la estructura en zonas dañadas y sanas del corazón. De esta manera, por ejemplo, el infarto de miocardio reduce la salida cardíaca máxima y el volumen bombeado en cada latido por el corazón. También se asocia al infarto de miocardio una estimulación de la síntesis de ADN producida en el intersticio, así como un incremento de la formación de colágeno en las áreas no afectadas del corazón.

**[0033]** Como resultado de las tensiones o esfuerzos incrementados impuestos al corazón en la hipertensión prolongada debida, por ejemplo, a la resistencia periférica total incrementada, la hipertrofia cardíaca desde hace mucho tiempo se ha asociado a la "hipertensión". Una característica del ventrículo que se ha hipertrofiado como resultado de la sobrecarga de presión crónica es un rendimiento diastólico reducido (Fouad *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 4:1500-1506, 1984; Smith *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 5:869-874, 1985). Se ha detectado un periodo prolongado de relajación del ventrículo izquierdo en la hipertensión esencial temprana, aún con función sistólica normal o supranormal (Hartford *et al.*, Hypertension 6:329-338, 1984). Sin embargo, no existe ningún paralelismo estrecho entre los niveles de presión sanguínea y la hipertrofia cardíaca. Aunque se ha informado en el ser humano mejora de la función del ventrículo izquierdo en respuesta a la terapia antihipertensiva, los pacientes tratados con un diurético (hidroclorotiazida), un  $\beta$ -bloqueante (propranolol) o un bloqueante del canal del calcio (diltiazem) han demostrado reversión de la hipertrofia ventricular izquierda, sin mejora de la función diastólica (Inouye *et al.*, Am. J. Cardiol. 53:1583-7, 1984).

**[0034]** Otra enfermedad cardíaca compleja asociada con la hipertrofia cardíaca es la "cardiomiopatía hipertrófica". Esta condición se caracteriza por una gran diversidad de características morfológicas, funcionales y clínicas (Maron *et al.*, N. Engl. J. Med. 316:780-789, 1987; Spirito *et al.*, N. Engl. J. Med. 320:749-755, 1989; Louie y Edwards, Prog. Cardiovasc. Dis. 36:275-308, 1994; Wigle *et al.*, Circulation 92:1680-1692, 1995), la heterogeneidad de las cuales se ve acentuada por el hecho de que afecta a pacientes de todas las edades (Spirito *et al.*, N. Engl. J. Med. 336:775-785, 1997). Los factores causativos de la cardiomiopatía hipertrófica también son diversos y no se entienden bien. En general, las mutaciones en genes codificantes de proteínas sarcoméricas se asocian con la cardiomiopatía hipertrófica. Datos recientes sugieren que las mutaciones de la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina podrían explicar aproximadamente 30 a 40 por ciento de los casos de cardiomiopatía hipertrófica familiar (Watkins *et al.*, N. Engl. J. Med. 326:1108-1114, 1992; Schwartz *et al.*, Circulation 91:532-540, 1995; Marian y Roberts, Circulation 92:1336-1347, 1995; Thierfelder *et al.*, Cell 77:701-712, 1994; Watkins *et al.*, Nat. Gen. 11:434-437, 1995). Aparte de la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina, otras localizaciones de las mutaciones genéticas incluyen la troponina T cardíaca, la topomiosina alfa, la proteína C ligadora de la miosina cardíaca, la cadena ligera de la miosina esencial y la cadena ligera de la miosina reguladora (ver Malik y Watkins, Curr. Opin. Cardiol. 12:295-302, 1997).

**[0035]** La "estenosis aórtica" supravalvular es un trastorno vascular heredado caracterizado por el estrechamiento de la aorta ascendente, aunque otras arterias, incluyendo las arterias pulmonares, también pueden verse afectadas. La estenosis aórtica no tratada puede conducir a presión intracardiaca incrementada, resultando en la hipertrofia miocárdica y finalmente a la insuficiencia cardíaca y a la muerte. La patogénesis de este trastorno no se entiende por completo, aunque la hipertrofia y posiblemente la hiperplasia del músculo liso medial son características prominentes de este trastorno. Se ha informado de que las variantes moleculares del gen de la elastina se encuentran implicadas en el desarrollo y la patogénesis de la estenosis aórtica (patente US nº 5.650.282, publicada el 2 de julio de 1997).

**[0036]** La "regurgitación valvular" se produce como resultado de enfermedades cardíacas que resultan en trastornos de las válvulas cardíacas. Diversas enfermedades, por ejemplo la fiebre reumática, pueden causar el encogimiento o el estiramiento del orificio valvular, mientras que otras enfermedades pueden resultar en endocarditis, una inflamación del endocardio o membrana de revestimiento de los orificios atrioventriculares y en la operación del corazón. Algunos defectos, tales como el estrechamiento de la estenosis valvular o el cierre defectuoso de la válvula resultan en una acumulación de sangre en la cavidad del corazón o regurgitación de sangre más allá de la válvula. Si no se corrige, la estenosis o insuficiencia valvular prolongada pueden resultar en hipertrofia cardíaca y daños asociados en el músculo cardíaco, que finalmente puede requerir la sustitución de la válvula.

**[0037]** El tratamiento de todos estos y otros trastornos cardiovasculares y endoteliales que pueden estar acompañados o no de hipertrofia cardíaca, se encuentran comprendidos en la presente invención.

**[0038]** Los términos "cáncer", "canceroso" y "maligno" se refiere o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por el crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carcinomas, incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen cáncer de las células escamosas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer celular de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, tal como el carcinoma hepático y el hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón, tal como el carcinoma de las células renales y tumores de Wilms, carcinoma de las células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer del tiroides, cáncer testicular, cáncer esofágico y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres preferentes para el tratamiento de la presente invención son los cánceres de mama, colon, pulmón, melanoma,

ovario y otros que implican tumores vasculares tal como se ha indicado anteriormente.

**[0039]** La expresión “agente citotóxico” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las mismas. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo 131I, 125I, 90Y y 186Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

**[0040]** Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, antagonistas del ácido fólico, antimetabolitos del metabolismo de los ácidos nucleicos, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos triazol o corticoesteroides. Entre los ejemplos específicos se incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido (“Ara-C”), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, taxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver la patente US nº 4.675.185), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se encuentran incluidos en esta definición los agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

**[0041]** La expresión “agente inhibidor del crecimiento” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, tal como una célula de cáncer sobreexpresante de Wnt, *in vitro* o *in vivo*. De esta manera, el agente inhibidor del crecimiento es un agente que reduce significativamente el porcentaje de las células malignas en la fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un tiempo diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la parada de G1 y la parada de la fase M. Entre los bloqueantes clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), el taxol y los inhibidores topo II, tales como doxorubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también llegan a detener la fase S, por ejemplo los agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en: *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, editores, capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13. Entre los ejemplos adicionales se incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del FGF ácido o básico, o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o de neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, de la proteína C o de la proteína S (ver la patente WO nº 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o un anticuerpo capaz de unirse al receptor HER2 (patente WO nº 89/06692), tal como el anticuerpo 4D5 (y equivalentes funcionales del mismo) (por ejemplo la patente WO nº 92/22653).

**[0042]** El término “tratamiento” se refiere a una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o de alterar la patología, de un trastorno cardiovascular, endotelial o angiogénico. El concepto de tratamiento se utiliza en el sentido más amplio, e incluye específicamente la prevención (profilaxis), moderación, reducción y curación de trastornos cardiovasculares, endoteliales o angiogénicos en cualquier etapa. Por consiguiente, el término “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o enlentecer (reducir) un trastorno cardiovascular o endotelial, tal como la hipertrofia, o un trastorno angiogénico, tal como el cáncer. Entre aquellos que requieren tratamiento se incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos con tendencia a padecer el trastorno o aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. El trastorno puede resultar de cualquier causa, incluyendo causas idiopáticas, cardiotróficas o miotróficas, o de isquemia o de insultos isquémicos, tales como el infarto de miocardio.

**[0043]** La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo, y no agudo, de manera que se mantenga el efecto inicial, tal como un efecto antihipertrófico, durante un periodo de tiempo prolongado.

**[0044]** El término “mamífero” para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo el ser humano, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de competición o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cerdos, etc. Preferentemente el mamífero es el ser humano.

**[0045]** La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

**[0046]** La expresión “agentes cardiovasculares o endoteliales” se refiere genéricamente a cualquier fármaco que actúa en el tratamiento de trastornos cardiovasculares y/o endoteliales. Son ejemplos de agentes cardiovasculares aquellos que estimulan la homeostasis vascular mediante la modulación de la presión sanguínea, tasa cardíaca, contractilidad cardíaca y biología del endotelio y del músculo liso, presentando la totalidad de dichos factores un papel en la enfermedad cardiovascular. Entre los ejemplos específicos de ellos se incluyen los antagonistas del receptor de la angiotensina II, los antagonistas del receptor de la endotelina, tales como, por ejemplo, BOSENTAN<sup>TM</sup> y MOXONODIN<sup>TM</sup>, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ); des-aspartato-angiotensina I; agentes trombolíticos, por ejemplo estreptoquinasa, uroquinasa, t-PA y una variante de t-PA específicamente diseñada para presentar una vida media

más prolongada y una especificidad para la fibrina muy elevada, TNK t-PA (a T103N, N117Q, variante de t-PA KHRR(296-299)AAAA, Keyt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3670-3674, 1994); agentes inotrópicos o hipertensivos, tales como la digoxigenina y agentes bloqueantes del receptor  $\beta$ -adrenérgico, por ejemplo propanolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutiolol, atenolol, metoprolol y carvedilol; inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ACE), por ejemplo quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril y lisinopril; diuréticos, por ejemplo corotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzitiazida, diclorfenamida, acetazolamida e indapamida; y bloqueantes del canal del calcio, por ejemplo diltiazem, nifedipina, verapamil, nicardipina. Una categoría preferente de este tipo es un agente terapéutico utilizado para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca o de una condición fisiológica necesaria en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, tal como la presión sanguínea elevada, la estenosis aórtica o el infarto de miocardio.

**[0047]** Los “agentes angiogénicos” y los “agentes endoteliales” son agentes activos que estimulan la angiogénesis y el crecimiento de las células endoteliales, respectivamente, o, en caso aplicable, la vasculogénesis. Lo anterior incluiría factores que aceleran la cicatrización de heridas, tales como la hormona del crecimiento, el factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), VEGF, VIGF, PDGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de esta familia, FGF y TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ .

**[0048]** Los “agentes angiostáticos” son agentes activos que inhiben la angiogénesis o la vasculogénesis o de otra manera inhiben o previenen el crecimiento de las células de cáncer. Entre los ejemplos se incluyen anticuerpos u otros antagonistas de agentes angiogénicos, tal como se ha definido anteriormente, tal como anticuerpos contra VEGF. Adicionalmente incluyen agentes citoterapéuticos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes apoptóticos y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anti-HER-2, anti-CD20 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos.

**[0049]** En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente activo (polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo) se refiere a una cantidad eficaz en el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial y angiogénico.

**[0050]** El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee parcial o totalmente, inhiba o neutralice una o más actividades biológicas de un polipéptido VEGF-E nativo dado a conocer en la presente invención, por ejemplo, en caso aplicable, la actividad mitogénica o angiogénica de la misma. Los antagonistas del polipéptido VEGF-E pueden actuar interfiriendo en la unión del polipéptido VEGF-E a un receptor celular, incapacitando o eliminando células que han sido activadas por el polipéptido VEGF-E o interfiriendo con la activación celular endotelial vascular tras la unión del polipéptido VEGF-E a un receptor celular. Todos dichos puntos de intervención con un antagonista de polipéptido VEGF-E deben considerarse equivalentes para los fines de la presente invención. Los antagonistas inhiben la actividad mitogénica, angiogénica u otra actividad biológica del polipéptido VEGF-E y de esta manera resultan útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por neovascularización excesiva no deseable, incluyendo, a título de ejemplo, tumores, y especialmente tumores malignos sólidos, artritis reumatoide, soriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras retinopatías, fibroplasia retrolenta, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias del tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante corneal y de otros tejidos e inflamación crónica. Los antagonistas también resultan útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por la permeabilidad vascular excesiva no deseable, tal como el edema asociado a tumores cerebrales, ascites asociado a tumores malignos, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericárdica (tal como la asociada a la pericarditis) y efusión pleural.

**[0051]** De manera similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido VEGF-E nativo dado a conocer en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas específicamente se incluyen anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos VEGF-E nativos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc.

**[0052]** Una “molécula pequeña” se define en la presente invención como aquella que presenta un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons.

**[0053]** La expresión “receptor de polipéptido VEGF-E” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un receptor celular del polipéptido VEGF-E, habitualmente un receptor de superficie celular presente sobre las células endoteliales vasculares, así como en variantes de las mismas, que conserva la capacidad de unirse al polipéptido VEGF-E.

**[0054]** El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales anti-polipéptido VEGF-E individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizadores) y composiciones de anticuerpo anti-VEGF-E con especificidad polipeptídica. La expresión “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden encontrarse presentes en cantidades menores.

**[0055]** El término “activo” o “actividad” para los fines de la presente invención se refieren a una o más formas de VEGF-E que conservan las actividades biológicas del polipéptido VEGF-E nativo o de origen natural.

**[0056]** La hibridación preferentemente se lleva a cabo bajo “condiciones astringentes”, que significa: (1) utilizar una fuerza iónica reducida y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C, o (2) utilizar durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo 50% (v/v) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 nM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C. Otro ejemplo es la utilización de 50% formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6/8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y dextrán sulfato al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1%. Todavía otro ejemplo es la hibridación utilizando un tampón de dextrán sulfato al 10%, 2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y 50% de formamida a 55°C seguido de un lavado de alta astringencia consistente de 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C. Pueden utilizarse otras condiciones previamente descritas y bien conocidas para alcanzar astringencias elevadas, bajas o moderadas. En el caso de que se proporcione una secuencia de ácidos nucleicos de una molécula de ácido nucleico, otras moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan a la misma bajo las condiciones indicadas anteriormente se consideran comprendidas dentro del alcance de la secuencia. Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos de una molécula de ácido nucleico tal como se proporciona en la presente invención presenta una identidad de secuencia de ácidos nucleicos de 70% u 80% con la secuencia SEC ID nº 1, posiciones 259 a 1.293. Más preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de ácidos nucleicos de 90% o 95% con la secuencia SEC ID nº 1, posiciones 259 a 1.293.

**[0057]** El término “transfección” se refiere a la asimilación de un vector de expresión por parte de una célula huésped, se expresen de hecho secuencias codificantes o no. Son conocidos por el experto ordinario en la materia numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo CaPO<sub>4</sub> y electroporación. La transfección con éxito se reconoce generalmente en el caso de que se produzca cualquier indicación del funcionamiento de dicho vector dentro de la célula huésped.

**[0058]** El término “transformación” se refiere a introducir ácido nucleico en un organismo de manera que el ácido nucleico sea replicable, en forma de elemento extracromosómico o de integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándares apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio utilizando cloruro de calcio, tal como describe Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:2110, 1972, y Mandel *et al.*, J. Mol. Biol. 53:154, 1970, se utiliza generalmente para procariontes u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. Para las células de mamífero, sin dichas paredes celulares, resulta preferente el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology 52:456-457, 1978. Se han descrito los aspectos generales de las transformaciones de sistemas de células huésped de mamífero en la patente US nº 4.399.216 de Axel, publicada el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, J. Bact. 130:946, 1977, y de Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:3829, 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ácidos nucleicos en células, tales como la inyección nuclear o la fusión de protoplasto.

**[0059]** La “mutagénesis sitio-dirigida” es un procedimiento estándar de la técnica, y se lleva a cabo utilizando un cebador oligonucleótido sintético complementario a un ácido nucleico fágico de una cadena que debe mutagenizarse, excepto por no correspondencias limitadas, representando la mutación deseada. Brevemente, el oligonucleótido sintético se utiliza como cebador para dirigir la síntesis de una cadena complementaria al fago, y el ácido nucleico de doble cadena resultante se transforma en una bacteria huésped que soporte fagos. Los cultivos de las bacterias transformadas se cultivan en placa en Top-ágar, permitiendo la formación de placas a partir de células individuales que incluyen el fago. En teoría, el 50% de las placas nuevas contendrá el fago, presentando, en forma de una cadena, la forma mutada; el 50% presentará la secuencia original. Las placas se hibridan con cebador sintético quinasado a una temperatura que permita la hibridación de una cadena de correspondencia exacta, pero a la que las no correspondencias con la cadena original resulten suficientes para impedir la hibridación. Las placas que se hibriden con la sonda seguidamente se seleccionan y se cultivan, y se recupera el ácido nucleico.

**[0060]** La expresión “operablemente ligado” se refiere a la yuxtaposición de manera que puede llevarse a cabo la función normal de los componentes. De esta manera, una secuencia codificante “operablemente ligada” a secuencias de control se refiere a una configuración en la que la secuencia codificante puede expresarse bajo el control de dichas secuencias y en la que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, son contiguas y se encuentran en la misma fase de lectura. Por ejemplo, el ácido nucleico de una presecuencia o líder secretor se encuentra operablemente ligado a un ácido nucleico para un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante si se encuentra localizada de manera que facilita la traducción. El ligamiento se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, se utilizan adaptadores o linkers oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

**[0061]** La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una

secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, un sitio de unión ribosómica, y posiblemente otras secuencias todavía poco conocidas. Las células eucarióticas es conocido que utilizan promotores, señales de poliadenilación e intensificadores.

5 **[0062]** La expresión “sistema de expresión” se refiere a secuencias de ADN que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en ligamiento operable, de manera que los huéspedes transformados con dichas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para llevar a cabo la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN relevante posteriormente también puede integrarse en el cromosoma huésped.

10 **[0063]** Tal como se utiliza en la presente invención, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan intercambiamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones “transformantes” o “células transformadas” incluyen la célula objetivo primaria y cultivos derivadas a partir de la misma con independencia del número de transferencias realizadas. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o espontáneas. Se encuentra incluida la progenie mutante que presenta la misma funcionalidad que la buscada en el cribado en la célula originalmente transformada. En el caso de que se pretendan designaciones diferentes, resultará evidente a partir del contexto.

15 **[0064]** Los “plásmidos” se designan con una p minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida de la presente invención se encuentran comercialmente disponibles, se encuentran disponibles públicamente de manera no restringida, o pueden construirse a partir de dichos plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. Además, son conocidos de la técnica otros plásmidos equivalentes y resultarán evidentes para el experto ordinario.

20 **[0065]** La “digestión” de ADN se refiere al corte catalítico del ADN con un enzima que actúa únicamente en determinadas localizaciones del ADN. Estos enzimas se denominan enzimas de restricción, y el sitio para el que es específico cada uno se denomina sitio de restricción. Los diversos enzimas de restricción utilizados en la presente invención se encuentran disponibles comercialmente y se utilizan las condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos establecidos por los suministradores del enzima. Los enzimas de restricción comúnmente se designan por abreviaturas compuestas de una letra mayúscula seguido de otras letras que representan el microorganismo del que se obtuvo originalmente cada enzima de restricción y a continuación un número que designa el enzima particular. En general, se utiliza aproximadamente 1 mg de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 1 a 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 ml de solución tampón. Los tampones y cantidades de sustrato apropiados para enzimas de restricción particulares las especifica el fabricante. Habitualmente se utiliza la incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero puede variar según las instrucciones del proveedor. Tras la incubación, se separa la proteína mediante extracción con fenol y cloroformo, y el ácido nucleico digerido se recupera de la fracción acuosa mediante precipitación con etanol. Tras la digestión con un enzima de restricción infrecuentemente se realiza una hidrólisis con fosfatasa alcalina bacteriana de los fosfatos 5' terminales para evitar que los dos extremos cortados por restricción de un fragmento de ADN se “circularicen” o formen un bucle cerrado que impediría la inserción de otro fragmento de ADN en el sitio de restricción. A menos que se indique lo contrario, tras la digestión de los plásmidos no se realiza la desfosforilación 5'-terminal. Los procedimientos y reactivos para la desfosforilación son convencionales (Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), páginas 133 a 134).

25 **[0066]** Los términos “recuperación” o “aislamiento” de un fragmento dado de ADN de un digerido de restricción se refiere a la separación del digerido en gel de poliacrilamida o de agarosa mediante electroforesis, a la identificación del fragmento de interés mediante comparación de su movilidad con la de fragmentos marcadores de ADN de peso molecular conocido, a la extracción de la sección de gel que contiene el fragmento deseado, y a la separación del gel del ADN. Este procedimiento se conoce de manera general. Por ejemplo ver Lawn *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:6103-6114, 1981, y Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980.

30 **[0067]** El “análisis southern” es un procedimiento por el que se confirma mediante hibridación con un oligonucleótido o fragmento de ADN marcado conocido la presencia de secuencias de ADN en un digerido o composición que contiene ADN. Para los fines de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, el análisis southern se referirá a la separación de digeridos en agarosa al 1 por ciento, desnaturalización y transferencia a nitrocelulosa mediante el procedimiento de Southern, J. Mol. Biol. 98:503-517, 1975, e hibridación tal como describen Maniatis *et al.*, Cell 15:687-701, 1978.

35 **[0068]** El término “ligación” se refiere al procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena (Maniatis *et al.*, 1982, *supra*, página 146). A menos que se indique lo contrario, la ligación puede conseguirse utilizando tampones y condiciones conocidas con 10 unidades T4 ADN ligasa (“ligasa”) por cada 0,5 mg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que deben ligarse.

40 **[0069]** La “preparación” de ADN a partir de transformantes se refiere a aislar ADN de plásmido a partir de cultivo microbiano. A menos que se indique lo contrario, puede utilizarse el procedimiento alcalino/SDS de Maniatis *et al.*,

1982, *supra*, página 90.

[0070] El término "oligonucleótidos" se refiere a polidesoxinucleótidos de cadena única o doble de longitud corta que se sintetizan químicamente mediante procedimientos conocidos (tales como química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita utilizando técnicas en fase sólida, tales como las descritas en la patente EP nº de publicación 266.032, publicada el 4 de mayo de 1988, o mediante intermediarios desoxinucleósido H-fosfonato, tal como describen Froehler *et al.*, Nucl. Acids. Res. 14:5399-5407, 1986. A continuación, se purifican en geles de poliacrilamida.

[0071] Entre los inhibidores de VEGF-E se incluyen aquellos que reducen o inhiben la actividad o expresión de VEGF-E e incluye las moléculas antisentido.

[0072] La abreviatura "KDR" se refiere a la región de dominio quinasa de la molécula de VEGF. VEGF-E no presenta homología con VEGF en este dominio.

[0073] La abreviatura "FLT-1" se refiere al dominio de unión de tirosina quinasa de tipo FMS que es conocido que se une al receptor FLT-1 correspondiente. VEGF-E no presenta homología con VEGF en este dominio.

[0074] La presente descripción proporciona secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican para polipéptidos, referidas en la presente solicitud como VEGF-E. En particular, ha sido identificado y aislado ADNc codificante de un polipéptido VEGF-E, tal como se da a conocer en más detalle en los Ejemplos que siguen. Utilizando el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST, se encontró que el polipéptido VEGF-E presentaba una determinada identidad de secuencia con VEGF y con BMP1.

#### B. Variantes de VEGF-E

[0075] Además del polipéptido VEGF-E de secuencia nativa de longitud completa indicado en la presente invención, se contempla que puedan prepararse variantes de VEGF-E. Las variantes de VEGF-E pueden prepararse mediante la introducción de cambios nucleótidos apropiados en el ADN codificante de VEGF-E, o mediante síntesis del polipéptido VEGF-E deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios aminoácidos pueden alterar procesos post-traduccionales del polipéptido VEGF-E, tal como la modificación del número o posición de los sitios de glucosilación o la alteración de las características de anclaje a membrana.

[0076] Pueden llevarse a cabo variaciones en la secuencia nativa de longitud completa de VEGF-E en diversos dominios del polipéptido VEGF-E indicado en la presente invención, por ejemplo utilizando cualquiera de las técnicas y las directrices para mutaciones conservativas y no conservativas proporcionadas, por ejemplo, en la patente US nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones codificantes del polipéptido VEGF-E que resultan en un cambio de la secuencia de aminoácidos del polipéptido VEGF-E en comparación con la VEGF-E de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido VEGF-E. Pueden encontrarse guías para determinar qué residuo aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar negativamente la actividad deseada mediante la comparación de la secuencia del polipéptido VEGF-E con la de moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en las regiones de homología elevada. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que presente propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o delecciones opcionalmente puede encontrarse comprendidas en el intervalo de entre 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a ensayo las variantes resultantes para actividad en los ensayos *in vitro* descritos en los Ejemplos, posteriormente.

[0077] Las variaciones pueden llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos de la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (sitio-dirigida), el rastreo de alaninas y la mutagénesis por PCR. Puede llevarse a cabo mutagénesis sitio-dirigida (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res. 13:4331, 1986; Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:6487, 1987), mutagénesis por inserción de casete (Wells *et al.*, Gene 34:315, 1985), mutagénesis por selección de restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415, 1986) u otras técnicas conocidas, sobre el ADN clonado, produciendo el ADN variante codificante de VEGF-E.

[0078] También puede utilizarse el análisis de rastreo de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferentes se encuentran los aminoácidos neutros pequeños. Entre estos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de rastreo preferente de entre este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina también es típicamente preferente debido a que es el aminoácido más común. Además, se encuentra preferentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas (Creighton, The Proteins (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol. 150:1, 1976). Si la sustitución de la alanina no da lugar a cantidades adecuadas de variante, puede utilizarse un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de VEGF-E

- 5 [0079] Las modificaciones covalentes de los polipéptidos VEGF-E se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente descripción. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos aminoácidos diana de un polipéptido VEGF-E con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales bifuncionales resulta útil, por ejemplo, para entrecruzar VEGF-E con una matriz de soporte o superficie insoluble en agua para la utilización en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-VEGF-E, y viceversa. Entre los agentes entrecruzantes utilizados comúnmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis-(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano, y agentes tales como metil-3-((p-azidofenil)-ditiio)propioimidato.
- 10 [0080] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo de los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79 a 86, 1983), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.
- 20 [0081] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido VEGF-E incluida dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. La expresión "alterar el patrón nativo de glucosilación" pretende referirse, para los fines de la presente invención, a deleccionar uno o más grupos carbohidrato que se encuentran en el polipéptido VEGF-E de secuencia nativa y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el polipéptido VEGF-E de secuencia nativa.
- 25 [0082] La adición de sitios de glucosilación a los polipéptidos VEGF-E puede llevarse a cabo mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de los mismos. La alteración puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la adición o la sustitución por uno o más residuos serina o treonina en la secuencia nativa del polipéptido VEGF-E (para los sitios de glucosilación O-ligados). La secuencia de aminoácidos de VEGF-E opcionalmente puede alterarse mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mediante mutación del ADN codificante del polipéptido VEGF-E en bases preseleccionadas, de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.
- 30 [0083] Otro medio de incrementar el número de grupos carbohidratos en el polipéptido VEGF-E es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dichos procedimientos se describen en la técnica, por ejemplo en la patente WO n° 87/05330, publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, páginas 259 a 306, 1981.
- 35 [0084] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido VEGF-E puede conseguirse química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones codificantes de residuos aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas de la técnica y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52, 1987, y en Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118:131, 1981. El corte enzimático de grupos carbohidrato en polipéptidos puede conseguirse mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, tal como describen Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138:350, 1987.
- 40 [0085] Otro tipo de modificación covalente de VEGF-E comprende unir el polipéptido VEGF-E a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes US n° 4.640.835, n° 4.496.689, n° 4.301.144, n° 4.670.417, n° 4.791.192 o n° 4.179.337.
- 45 [0086] Los polipéptidos VEGF-E de la presente invención también pueden modificarse de manera que formen moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido VEGF-E fusionado con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido VEGF-E con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epítipo generalmente se sitúa en el extremo aminoterminal o carboxilo-terminal del polipéptido VEGF-E. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo de un polipéptido VEGF-E puede detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión de una etiqueta epítipo permite purificarse fácilmente el polipéptido VEGF-E mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epítipo. En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido VEGF-E con una inmunoglobulina o con una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula de IgG.
- 50 [0087] Diversos polipéptidos etiqueta y los anticuerpos respectivos de los mismos son bien conocidos de la técnica. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de polihistidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165, 1988); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma (Evan *et al.*, *Molecular and Cellular*

Biology 5:3610-3616, 1985) y la glucoproteína D (gD) del virus del herpes simplex y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3(6):547-553, 1990). Otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, BioTechnology 6:1204-1210, 1988); el péptido epítipo KT3 (Martin *et al.*, Science 255:192-194, 1992), un péptido epítipo  $\alpha$ -tubulina (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem. 266:15163-15166, 1991) y la etiqueta péptido de la proteína del gen 10 de T7 (Lutz-Freyemuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393-6397, 1990).

#### D. Preparación de VEGF-E

[0088] La descripción posterior se refiere principalmente a la producción de VEGF-E mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene por lo menos el ácido nucleico codificante mostrado en la figura 1, partiendo del codón de inicio rodeado y finalizando inmediatamente antes del codón de parada. Evidentemente se encuentra contemplado que procedimientos alternativos que son bien conocidos de la técnica puedan utilizarse para preparar polipéptidos VEGF-E. Por ejemplo, la secuencia de VEGF-E, o partes del mismo, pueden producirse mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas en fase sólida (ver, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963). La síntesis *in vitro* de proteínas puede llevarse a cabo utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente de manera separada diversas partes de los polipéptidos VEGF-E y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir un polipéptido VEGF-E de longitud completa.

##### 1. Aislamiento de ADN codificante de VEGF-E

[0089] El ADN codificante de un polipéptido VEGF-E puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm de VEGF-E y para expresarlo a nivel detectable. Por consiguiente, puede obtenerse convenientemente ADN codificante de VEGF-E obtenido a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen codificante de VEGF-E también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

[0090] Pueden cribarse bibliotecas con sondas (tales como anticuerpos contra un polipéptido VEGF-E u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 17 a 80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado de ADNc o de la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares, tales como los descritos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo de aislar el gen codificante de VEGF-E es utilizar metodología de PCR (Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

[0091] Los Ejemplos posteriormente describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente inequívocas para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido preferentemente se marca de manera que pueda detectarse tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcaje son bien conocidos de la técnica, e incluyen la utilización de marcajes radioactivos, por ejemplo ATP marcado con  $^{32}\text{P}$ , biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia reducida, la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*, 1989.

[0092] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa, puede determinarse mediante el alineamiento de secuencias utilizando programas informáticos, tales como ALIGN, DNASTAR e INHERIT.

[0093] El ácido nucleico que presenta secuencia codificante de proteína puede obtenerse mediante el cribado de bibliotecas seleccionadas de ADNc o genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida que se da a conocer en la presente invención por primera vez y, en caso necesario, utilizando procedimientos de extensión de cebador convencionales, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, 1989, para detectar y procesar intermediarios de ARNm que pueden no haber sido transcritos reversamente para formar ADNc.

##### 2. Selección y transformación de células huésped

[0094] Las células huésped se transfectan o se transforman con vectores de expresión o de clonación indicados en la presente invención para la producción de polipéptido VEGF-E y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según resulte apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto en la materia sin necesidad de experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares puede encontrarse en: Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, editor (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*, 1989.

5 **[0095]** Los procedimientos de transfección son conocidos por el experto ordinario en la materia, por ejemplo CaPO<sub>4</sub> y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se lleva a cabo utilizando técnicas estándares apropiados para dichas células. El tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, 1989, o la electroporación se utilizan generalmente para procariontes u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede utilizarse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology* 52:456-457, 1978. Se han descrito los aspectos generales de las transformaciones de sistemas de células huésped en la patente US n° 4.399.216. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo siguiendo el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.* 130:946, 1977 y de Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:3829, 10 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo polibreno o poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero ver Keown *et al.*, *Methods in Enzymology* 185:527-537, 1990, y Mansour *et al.*, *Nature* 336:348-352, 1988.

15 **[0096]** Entre las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células de procarionte, de levadura o de eucariota superior. Entre los procariontes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo enterobacteriáceas, tales como *E. coli*. Se encuentran disponibles públicamente diversas cepas de *E. coli*, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC n° 31.446), *E. coli* X1776 (ATCC n° 31.537), *E. coli* cepa W3110 (ATCC n° 27.325) y K5 772 (ATCC n° 53.635).

20 **[0097]** Además de los procariontes, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levaduras resultan huéspedes de clonación o de expresión adecuados para vectores codificantes de VEGF-E. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado comúnmente.

25 **[0098]** Las células huésped adecuadas para la expresión de VEGF-E glucosilado se derivan a partir de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen células de insecto, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Entre los ejemplos más específicos se incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC n° CRL 1651), la línea renal embrionaria humana (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59, 1977), células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30 77:4216, 1980), células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980), células pulmonares humanas (W138, ATCC n° CCL 75), células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065) y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC n° CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se considera que se encuentra comprendida dentro de los conocimientos de la técnica.

### 3. Selección y utilización de un vector replicable

35 **[0099]** El ácido nucleico (por ejemplo ADNc o ADN genómico) codificante del polipéptido VEGF-E deseado puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran disponibles públicamente diversos vectores. El vector puede encontrarse, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, se inserta ADN en uno o más sitios de endonucleasa de restricción 40 apropiados utilizando técnicas conocidas de la técnica. Entre los componentes del vector generalmente se incluyen, aunque sin limitación, uno o más de entre una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de dichos componentes utilizan técnicas de ligación estándares que son conocidos del experto en la materia.

45 **[0100]** El polipéptido VEGF-E deseado puede producirse recombinantemente no sólo directamente, sino también en forma de polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que presente un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN codificante de VEGF-E que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procarionte 50 seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, el lpp o los líderes de enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder factor alfa (incluyendo los líderes de factor  $\alpha$ , estos últimos descritos en la patente US n° 5.010.182) o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (patente EP n° 362.179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en la patente WO n° 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 55 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias de señal de mamífero pueden utilizarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como las secuencias de señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como líderes secretorios víricos.

60 **[0101]** Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido Pbr322 resulta adecuado para la

mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen de plásmidos resulta adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) resultan útiles para los vectores de clonación en las células de mamífero.

5 **[0102]** Los vectores de expresión y de clonación típicamente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que: (a) proporcionan resistencia frente a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementar deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo el gen codificante de la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

10 **[0103]** Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la incorporación de ácido nucleico codificante de VEGF-E, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada en el caso de que se utilice DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada tal como describen Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980. Un gen de selección adecuado para la utilización en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchbom *et al.*, Nature 282:39, 1979; Kingsman *et al.*, Gene 7:141, 1979, Tschemper *et al.*, Gene 10:157, 1980). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC nº 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12, 1977).

20 **[0104]** Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un promotor operablemente ligado a la secuencia de ácido nucleico codificante de VEGF-E para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un diversidad de potenciales células huésped son bien conocidos. Entre los promotores adecuados para la utilización con huésped procarióticos se incluyen los sistemas de promotor  $\beta$ -lactamasa y lactosa (Chang *et al.*, Nature 275:615, 1978; Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1979), fosfatasa alcalina, un sistema de promotor triptófano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980; patente EP nº 36.776) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* (deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983). Los promotores para la utilización en los sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operablemente ligada al ADN codificante del polipéptido VEGF-E.

30 **[0105]** Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para la utilización con huéspedes levaduras se incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) y otros enzimas glucolíticos (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland, Biochemistry 17:4900, 1978), tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la trifosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa.

35 **[0106]** Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que presentan la ventaja adicional de que la transcripción está controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados al metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y de la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en la patente EP nº 73.657. La transcripción de VEGF-E a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar (patente UK nº 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B, y el virus 40 del simio (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor actina o un promotor inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

45 **[0107]** La transcripción de un ADN codificante de un polipéptido VEGF-E por parte de eucariotas superiores puede incrementarse mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de entre aproximadamente 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor incrementando la transcripción del mismo. En la actualidad se conocen muchas secuencias intensificadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\beta$ -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente se utiliza un intensificador de un virus de célula eucariótica. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el intensificador del promotor temprano del citomegalovirus, el intensificador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y los intensificadores de adenovirus. El intensificador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificante de VEGF-E, aunque preferentemente se localiza en un sitio 5' respecto al promotor.

55 **[0108]** Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Estas secuencias se encuentran comúnmente disponibles a partir de las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas de los ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos en forma de fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm codificante de VEGF-E.

60

**[0109]** Todavía otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación en la síntesis de los polipéptidos VEGF-E en cultivo celular de vertebrado recombinante se escriben en Gething *et al.*, Nature 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, Nature 281:40-46, 1979; patente EP nº 117.060 y nº 117.058.

#### 4. Detección de la amplificación/expresión génica

5 **[0110]** La amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern-northern convencional para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980), transferencia por puntos (análisis del ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, 10 y dúplex híbridos ADN-ARN o dúplex ADN-proteína. Los anticuerpos, a su vez, pueden marcarse y el ensayo llevarse a cabo donde el dúplex se encuentra unido a una superficie, de manera que tras la formación de dúplex sobre la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

15 **[0111]** La expresión génica alternativamente puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de células o de secciones de tejido y el ensayo de cultivos celulares o líquidos corporales, cuantificando directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido VEGF-E de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra secuencias exógenas fusionadas con ADN codificante de VEGF-E y codificantes de un epítipo específico de anticuerpo. 20

#### 5. Purificación de polipéptido

**[0112]** Pueden recuperarse formas de VEGF-E a partir del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Las células utilizadas en la expresión de los polipéptidos VEGF-E puede alterarse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como el ciclado congelación-descongelación, la sonicación, la rotura mecánica o agentes de lisado celular. 25 Puede resultar deseable purificar VEGF-E a partir de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes. Los procedimientos siguientes son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase reversa; cromatografía en sílice o en resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de sefarsa-proteína A para eliminar contaminantes, tales como IgG; y columnas de quelantes metálicos para ligar formas etiquetadas con epítipo del polipéptido VEGF-E. Pueden utilizarse diversos procedimientos de purificación de proteínas y estos procedimientos son conocidos de la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology 182, 1990; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1982. La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado y del polipéptido VEGF-E particular producido. 30 35

**[0113]** Debido a que VEGF puede agregarse formando dímeros, se encuentra comprendido dentro del alcance de I presente invención proporcionar heterodímeros y homodímeros. En el caso de que una o más subunidades sean variantes, los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes para cada cadena subunidad. Los heterodímeros se producen con facilidad mediante cotransformación de células huésped con ADN codificante de ambas subunidades y, en caso necesario, purificando el heterodímero deseado, o mediante la síntesis separada de las subunidades, disociando las subunidades (por ejemplo mediante tratamiento con un agente caotrópico, tal como urea, hidrocloreto de guanidina o similar), mezclando las subunidades disociadas y después reasociando las subunidades eliminando mediante diálisis el agente caotrópico. 40

#### E. Usos de VEGF-E y formulaciones

##### 45 1. Ensayos para actividad cardiovascular, endotelial y angiogénica

**[0114]** Pueden utilizarse diversos ensayos para someter a ensayo el polipéptido de la presente invención para actividad cardiovascular, endotelial y angiogénica. Entre estos ensayos se incluyen aquellos proporcionados en los Ejemplos, posteriormente.

50 **[0115]** Entre los ensayos para la actividad antagonista de la endotelina, tal como se da a conocer en la patente US nº 5.773.414 se incluye un ensayo de ligamiento de ventrículo cardiaco de rata, en el que el polipéptido se somete a ensayo para su capacidad de inhibir la unión de endotelina 1 yodinizada en un ensayo de receptor, un ensayo de ligamiento de receptor de endotelina para someter a ensayo la unión de células intactas a endotelina 1 marcada radioactivamente utilizando células de músculo liso vascular arterial renal de conejo, un ensayo de acumulación de fosfato de inositol, en el que se determina la actividad funcional en células Rat-1 mediante la medición de los niveles intracelulares de segundos mensajeros, un ensayo de liberación de ácido araquidónico que mide la capacidad de los compuestos añadidos de reducir la liberación de ácido araquidónico estimulada por endotelina en músculo liso vascular en cultivo, estudios *in vitro* (vasos aislados) utilizando endotelio procedente de conejos New Zealand machos, y estudios *in vivo* utilizando ratas Sprague-Dawley macho. Entre los ensayos para la actividad de 55

generación de tejidos sin incluyen, sin limitación, aquellos descritos en la patente WO n° 95/16035 (hueso, cartílago, tendón); patentes WO n° 95/05846 (nervios, neuronas) y n° 91/07491 (piel, endotelio).

**[0116]** Entre los ensayos para actividad cicatrizante de heridas se incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en Winter, *Epidermal Wound Healing*, Maibach, HI y Rovee, DT, editores (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), páginas 71 a 112, según modificación por el artículo de Eaglstein y Mertz, J. *Invest. Dermatol.* 71:382-384, 1978.

**[0117]** Un ensayo para cribar para una molécula de ensayo referente a un polipéptido VEGF-E que liga un polipéptido receptor de endotelina B1 (ETB1) y modula la actividad de transducción de señales implica proporcionar una célula huésped transformada con un ADN codificante de polipéptido receptor de endotelina B1, exponer las células al compuesto candidato del ensayo, y medir la actividad de transducción de señales del receptor de endotelina B1, tal como se describen, por ejemplo, en la patente US n° 5.773.223.

**[0118]** Existen varios ensayos de hipertrofia cardiaca. Entre los ensayos *in vitro* se incluyen la inducción de la expansión de los miocitos cardiacos de rata adulta. En este ensayo, se aíslan miocitos ventriculares de una sola rata (Sprague-Dawley macho), esencialmente según una modificación del procedimiento descrito en detalle por Piper *et al.*, "Adult ventricular rat heart muscle cells", en: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, H.M. Piper, editor (Berlin: Springer-Verlag, 1990), páginas 36 a 60. Este procedimiento permite el aislamiento de miocitos ventriculares adultos y el cultivo de largo plazo de estas células en el fenotipo de forma de cilindro. Se ha demostrado que la fenilefrina y la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) inducen una respuesta de expansión en estas células adultas. Seguidamente se somete a ensayo la inhibición de la extensión de los miocitos inducida por PGF<sub>2α</sub> o por análogos de PGF<sub>2α</sub> (por ejemplo fluprostenol) y fenilefrina por diversos inhibidores potenciales de la hipertrofia cardiaca.

**[0119]** Un ejemplo de un ensayo *in vivo* es un ensayo de inhibición de la hipertrofia cardiaca inducida por fluprostenol *in vivo*. Este modelo farmacológico somete a ensayo la capacidad del polipéptido VEGF-E de inhibir la hipertrofia cardiaca inducida en ratas (por ejemplo en ratas Wistar o Sprague-Dawley macho) mediante inyección subcutánea de fluprostenol (un análogo agonista de PGF<sub>2α</sub>). Es conocido que las ratas con hipertrofia cardiaca patológica inducida por infarto de miocardio presentan niveles crónicamente elevados de PGF<sub>2α</sub> extraíble en su miocardio (Lai *et al.*, *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 271:H2197-H2208, 1996). Por consiguiente, los factores que pueden inhibir los efectos del fluprostenol sobre el crecimiento miocárdico *in vivo* resultan potencialmente útiles en el tratamiento de la hipertrofia cardiaca. Los efectos del polipéptido VEGF-E sobre la hipertrofia cardiaca se determinan midiendo el peso de corazón, ventrículos y ventrículo izquierdo (normalizado respecto al peso corporal) en comparación con ratas tratadas con fluprostenol que no reciben el polipéptido VEGF-E.

**[0120]** Otro ejemplo de un ensayo *in vivo* es el ensayo de hipertrofia cardiaca por sobrecarga de presión. Para el ensayo *in vivo*, es común inducir hipertrofia cardiaca por sobrecarga de presión mediante constricción de la aorta abdominal de los animales de ensayo. En un protocolo típico, las ratas (por ejemplo Wistar o Sprague-Dawley macho) se tratan bajo anestesia, y la aorta abdominal de cada rata se estrecha inmediatamente por debajo del diafragma (Beznak, M., *Can. J. Biochem. Physiol.* 33:985-94, 1955). La aorta se expone mediante una incisión quirúrgica, y se sitúa una aguja roma contiguamente al vaso. La aorta se constriñe con una ligadura de hilo de seda alrededor de la aguja, que se retira inmediatamente y que reduce la luz de la aorta hasta el diámetro de la aguja. Ese enfoque se describe, por ejemplo, en Rossi *et al.*, *Am. Heart J.* 124:700-709, 1992 y en O'Rourke y Reibel, *P.S.E.M.B.* 200:95-100, 1992.

**[0121]** En todavía otro ensayo *in vivo*, se mide el efecto sobre la hipertrofia cardiaca tras el infarto de miocardio (IM) inducido experimentalmente. Se induce IM agudo en ratas mediante ligación de la arteria coronaria izquierda y se confirma mediante examen electrocardiográfico. Asimismo, se prepara un grupo de animales falsamente operados como animales de control. Los datos anteriores han demostrado que la hipertrofia cardiaca se encuentra presente en el grupo de animales con IM, según evidencia un incremento de 18% en la proporción de peso cardíaco-peso corporal (Lai *et al.*, *supra*). El tratamiento de estos animales con candidatos a bloqueantes de hipertrofia cardiaca, por ejemplo el polipéptido VEGF-E, proporciona información valiosa sobre el potencial terapéutico de los candidatos sometidos a ensayo. Un ensayo adicional de este tipo para la inducción de la hipertrofia cardiaca se da a conocer en la patente US n° 5.773.415, utilizando ratas Sprague-Dawley.

**[0122]** Para el cáncer, puede utilizarse una diversidad de modelos animales bien conocidos para entender mejor el papel de los genes identificados en la presente invención en el desarrollo y la patogénesis de los tumores, y para someter a ensayo la eficacia de agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos y otros antagonistas de los polipéptidos VEGF-E nativos, tales como los antagonistas de molécula pequeña. La naturaleza *in vivo* de estos modelos los hace particularmente predictivos de respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de tumores y cánceres (por ejemplo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, etc.) incluye animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Entre los modelos animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, modelos de roedor, por ejemplo murinos. Estos modelos pueden generarse mediante la introducción de células tumorales en ratones singénicos utilizando técnicas estándares, por ejemplo la inyección subcutánea, la inyección en la vena de la cola, la implantación de bazo, el implante intraperitoneal, el implante bajo la cápsula renal o la implantación de ortopina, por ejemplo células de cáncer de colon implantadas en tejido colónico (ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT n° WO97/33551, publicada el 18 de septiembre de

1997).

**[0123]** Probablemente la especie animal utilizada más frecuentemente en estudios oncológicos son los ratones inmunodeficientes y en particular los ratones desnudos. La observación de que el ratón desnudo con hipoaplasia del timo podía actuar con éxito como huésped de xenoinjertos de tumor humano ha llevado a su utilización generalizada para este fin. El gen nu recesivo autosómico ha sido introducido en un gran número de cepas congénicas diferentes de ratones desnudos, incluyendo por ejemplo, ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII y SJL. Además, se han criado y utilizado como receptores de xenoinjertos tumorales una amplia diversidad de otros animales con defectos inmunológicos heredados que no son el ratón desnudo. Para detalles adicionales ver, por ejemplo, *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven y B. Winograd, editores (CRC Press, Inc., 1991).

**[0124]** Las células introducidas en dichos animales pueden derivarse de líneas celulares conocidas de tumor/cáncer, tales como cualquiera de las líneas celulares tumorales anteriormente indicadas y, por ejemplo, la línea celular B104-1-1 (línea celular NIH-3T3 estable transfectada con el protooncogén neu); células NIH-3T3 transfectadas por ras; Caco-2 (ATCC nº HTB-37) o una línea celular de adenocarcinoma de colon humano de grado II bien diferenciada, HT-29 (ATCC nº HTB-38) o de tumores y cánceres. Pueden obtenerse muestras de células tumorales o de cáncer de pacientes sometidos a cirugía, utilizando condiciones estándares que implican la congelación y el almacenamiento en nitrógeno líquido (Karmali *et al.*, Br. J. Cancer 48:689-696, 1983).

**[0125]** Las células tumorales pueden introducirse en animales tales como ratones desnudos mediante una diversidad de procedimientos. El espacio subcutáneo (S.C.) en ratones resulta muy adecuado para la implantación de tumores. Los tumores pueden transplantarse s.c. en forma de bloques sólidos, de biopsias de aguja mediante la utilización de un trócar, o en forma de suspensiones celulares. Las suspensiones celulares se preparan frescas a partir de tumores primarios o de líneas celulares tumorales estables y se inyectan subcutáneamente. Las células tumorales también pueden inyectarse en forma de implantes subdérmicos. En esta localización, el inóculo se deposita entre la parte inferior del tejido conectivo dérmico y el tejido s.c.

**[0126]** Pueden generarse modelos animales de cáncer de mama, por ejemplo mediante la implantación de células de neuroblastoma de rata (a partir del que se aisló inicialmente el oncogén neu) o células NIH-3T3 transformadas por neu en ratones desnudos, esencialmente tal como describen Drebin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9129-9133, 1986.

**[0127]** De manera similar, los modelos animales de cáncer de colon pueden generarse mediante pasaje de células de cáncer de colon en animales, por ejemplo ratones desnudos, conduciendo a la aparición de tumores en estos animales. Se ha descrito un modelo de trasplante ortotópico de cáncer de colon humano en ratones desnudos por ejemplo en Wang *et al.*, Cancer Research 54:4726-4728, 1994, y en Too *et al.*, Cancer Research 55:681-684, 1995. Este modelo se basa en el denominado "METAMOUSE" comercializado por AntiCancer Inc. (San Diego, California).

**[0128]** Los tumores que aparecen en animales pueden extraerse y cultivarse *in vitro*. Las células de los cultivos *in vitro* seguidamente pueden subcultivarse en animales. Estos tumores pueden servir como dianas para el ensayo posterior o para el cribado de fármacos. Alternativamente, los tumores resultantes del pase pueden aislarse y el ARN de células antes del pase y células aisladas después de una o más rondas del pase se analizan para la expresión diferencial de los genes de interés. Estas técnicas de pase pueden llevarse a cabo con cualquier tumor o con cualquier línea celular de cáncer.

**[0129]** Por ejemplo, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21 y WEHI-164 son fibrosarcomas inducidos químicamente de ratones BALB/c hembra (DeLeo *et al.*, J. Exp. Med. 146:720, 1977), que proporcionan un sistema modelo altamente controlable para estudiar las actividades antitumorales de diversos agentes (Palladino *et al.*, J. Immunol. 138:4023-4032, 1987). Brevemente, se propagan células tumorales *in vitro* en cultivo celular. Previamente a la inyección en los animales, las líneas celulares se lavan y se suspenden en tampón a una densidad celular de aproximadamente  $10 \times 10^6$  a  $10 \times 10^7$  células/ml. A continuación, los animales se infectan subcutáneamente con  $10 \mu\text{l}$  de suspensión celular, dejando una a tres semanas para la aparición del tumor.

**[0130]** Además, el carcinoma de pulmón de Lewis (ELL) de ratón, que es uno de los tumores experimentales estudiado más intensivamente, puede utilizarse como modelo investigacional de tumor. La eficacia en este modelo tumoral se ha correlacionado con los efectos beneficiosos del tratamiento de pacientes humanos diagnosticados con carcinoma de células pequeñas del pulmón (SCCL). Este tumor puede introducirse en ratones normales tras la inyección de fragmentos de tumor de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo (Zupi *et al.*, Br. J. Cancer 41:supl. 4, 30, 1980). La evidencia indica que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección de incluso una única célula y que sobrevive una proporción muy elevada de las células tumorales infectadas. Para información adicional sobre este modelo tumoral, ver Zacharski, Haemostasis 16:300-320, 1986.

**[0131]** Una manera de evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo en un modelo animal con un tumor implantado es medir el tamaño del tumor antes y después del tratamiento. Tradicionalmente, se ha medido el tamaño de los tumores implantadas con un calibrador Vernier en dos o tres dimensiones. La medición limitada a dos dimensiones no refleja exactamente el tamaño del tumor; por lo tanto, habitualmente se convierte en el volumen

correspondiente mediante la utilización de una fórmula matemática. Sin embargo, la medición del tamaño del tumor es muy inexacta. Los efectos terapéuticos de un fármaco candidato puede describirse mejor como el retraso del crecimiento inducido por el tratamiento y el retraso específico del crecimiento. Otra variable importante en la descripción del crecimiento tumoral es el tiempo de doblado del volumen tumoral. Los programas informáticos para el cálculo y la descripción del crecimiento tumoral también se encuentran disponibles, tales como el programa informado por Rygaard y Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu y Sheng, editores (Basel, 1989), página 301. Sin embargo, se indica que las respuestas de necrosis e inflamatoria tras el tratamiento podrían resultar realmente en un incremento del tamaño tumoral, por lo menos inicialmente. Por lo tanto, estos cambios deben registrarse cuidadosamente, mediante una combinación de un procedimiento morfométrico y el análisis de citometría de flujo.

**[0132]** Además, también pueden utilizarse ácidos nucleicos que codifican polipéptido VEGF-E o cualquiera de sus formas modificadas para generar animales transgénicos o animales “knock-out” que, a su vez, resultan útiles en el desarrollo y el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo un ratón o una rata) es un animal que presenta células que contienen un transgén, transgén que se introdujo en el animal o en un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir del que se desarrolla un animal transgénico. Por lo tanto, pueden construirse modelos animales recombinantes (transgénicos) mediante la introducción de la parte codificante de los genes codificantes de VEGF-E identificados en la presente invención en el genoma de los animales de interés utilizando técnicas estándares para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo babuinos, chimpancés y monos. En una realización, puede utilizarse ADNc codificante del polipéptido VEGF-E para clonar ADN genómico codificante de VEGF-E según técnicas establecidas y utilizar las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN codificante de VEGF-E. Las técnicas conocidas en el estado de la técnica para introducir un transgén en dichos animales incluyen la microinyección pronucleica (patente US nº 4.873.191), transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas embrionarias (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6148-615 (1985)); reconocimiento génico en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56:313-321, (1998)); electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814, (1983)) y transferencia génica mediada por espermatozoides (Lavitrano *et al.*, Cell 57:717-73, (1989)). Para una revisión véase, por ejemplo, la patente US nº 4.736.866. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas se han convertido en convencionales de la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 4.736.866 y nº 4.870.009. Por regla general, se marcarán determinadas células para la incorporación del transgén de VEGF-E con intensificadores específicos de tejido. Para examinar el efecto de la expresión incrementada de ADN codificante de VEGF-E pueden utilizarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén codificante de VEGF-E introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria. Dichos animales pueden utilizarse como animales de ensayo para reactivos que se cree proporcionan protección frente a, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas a la sobreexpresión de los mismos. Según esta faceta de la invención, se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida de la condición patológica en comparación con los animales no tratados que portan el transgén indicaría una potencial intervención terapéutica para la condición patológica.

**[0133]** Para el fin de la presente invención, los animales transgénicos incluyen aquellos que portan el transgén únicamente en parte de sus células (“animales mosaico”). El transgén puede integrarse en forma de un único transgén, o en concatámeros, por ejemplo tándems de cabeza con cabeza o de cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo celular particular también resulta posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-636, 1992. La expresión del transgén en animales transgénicos puede monitorizarse mediante técnicas estándares. Por ejemplo, puede utilizarse el análisis de transferencia Southern o la amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. A continuación, puede analizarse el nivel de expresión de ARNm utilizando técnicas tales como la hibridación *in situ*, el análisis de transferencia Northern, la PCR o la inmunocitoquímica. Los animales se examinan adicionalmente para indicios de desarrollo de tumor o cáncer.

**[0134]** Alternativamente, pueden construirse animales “knock-out” que presenten un gen defectuoso o alterado codificante de un polipéptido VEGF-E identificado en la presente invención, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno codificante del polipéptido VEGF-E y ADN genómico alterado codificante del mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede utilizarse ADNc codificante de un polipéptido VEGF-E particular para clonar ADN genómico codificante de dicho polipéptido según las técnicas establecidas. Puede delecionarse o sustituirse por otro gen, una parte del ADN genómico codificante de un polipéptido VEGF-E particular, tal como un gen codificante de un marcador seleccionarse que puede utilizarse para monitorizar la integración. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector (ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell 51:503, 1987) para una descripción de los vectores de recombinación homóloga. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno (ver, por ejemplo, Li *et al.*, Cell 69:915, 1992). A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación (ver, por ejemplo, Bradley, en: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical

Approach, E.J. Robertson, editor (IRL: Oxford, 1987), páginas 113 a 152. A continuación, el embrión quimérico puede implantarse en un animal huésped hembra pseudopreñada y el embrión llevarse a término para crear un animal "knock-out". La progenie que porta el ADN recombinado homológamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares y utilizarse para criar animales en los que las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente a determinadas condiciones patológicas y por el desarrollo en los mismos de condiciones patológicas debidas a la ausencia del polipéptido VEGF-E.

**[0135]** La eficacia de los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos VEGF-E identificados en la presente invención, y otros fármacos candidatos, también puede someterse a ensayo en el tratamiento de tumores animales espontáneos. Una diana adecuada para estos estudios es el carcinoma oral felino de células escamosas (SCC). El SCC oral felino es un tumor maligno altamente invasivo que es el cáncer oral más común en los felinos, al suponer más de 60% de los tumores orales informados en esta especie. Raramente metastatiza a sitios distante, aunque esta baja incidencia de metástasis podría ser meramente un reflejo de los cortos tiempos de supervivencia de los felinos con este tumor. Estos tumores habitualmente no son operables quirúrgicamente, principalmente debido a la anatomía de la cavidad oral felina. En la actualidad no existe tratamiento eficaz para este tipo de tumor. Previamente a la entrada en el presente estudio, cada felino se sometió a un examen clínico completo y a biopsia y se escaneó mediante tomografía computerizada (CT). Los felinos en los que se diagnosticaron tumores orales sublinguales de células escamosas fueron excluidos del estudio. La lengua puede resultar paralizada como resultado de dicho tumor e incluso si el tratamiento elimina el tumor, los animales podrían no ser capaces de alimentarse. Cada felino se trató repetidamente durante un periodo de tiempo más prolongado. Se obtuvieron fotografías de los tumores diariamente durante el periodo de tratamiento y en cada examen posterior. Tras el tratamiento cada felino se sometió a otra CT. Posteriormente, las CT y los radiogramas torácicos se evaluaron cada 8 semanas. Los datos se evaluaron para diferencias de supervivencia, respuesta y toxicidad en comparación con los grupos de control. La respuesta positiva podría requerir evidencia de la regresión del tumor, preferentemente con mejora de la calidad de vida y/o un tiempo de vida incrementado.

**[0136]** Además, también pueden someterse a ensayo otros tumores animales espontáneos, tales como el fibrosarcoma, el adenocarcinoma, el linfoma, el condroma o el leiomiomasarcoma de perros, gatos y babuinos. De entre estos, el adenocarcinoma mamario en perros y gatos es un modelo preferente debido a que su apariencia y comportamiento son muy similares a aquellos en el ser humano. Sin embargo, la utilización de este modelo se encuentra limitada por la incidencia infrecuente de este tipo de tumor en animales.

**[0137]** Otros ensayos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos *in vitro* e *in vivo* conocidos de la técnica también resultan adecuados en la presente invención.

## 2. Distribución en tejidos

**[0138]** Los resultados de los ensayos cardiovascular, endotelial y angiogénico de la presente invención pueden verificarse mediante estudios adicionales, tal como mediante la determinación de la expresión de ARNm en diversos tejidos humanos.

**[0139]** Tal como se ha indicado anteriormente, la amplificación génica y/o expresión génica en diversos tejidos puede medirse mediante transferencia southern-northern convencional para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980), transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* utilizando una sonda apropiadamente marcada, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína.

**[0140]** Alternativamente, la expresión génica en diversos tejidos puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo de cultivos celulares o líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido VEGF-E de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada con el ADN codificante de VEGF-E y codificante de un epítipo de anticuerpo específico. Las técnicas generales para generar anticuerpos, y protocolos específicos para la hibridación *in situ* se proporcionan posteriormente en la presente memoria.

## 3. Estudios de ligamiento de anticuerpos

**[0141]** Los resultados del estudio cardiovascular, endotelial y angiogénico pueden verificarse adicionalmente mediante estudios de ligamiento de anticuerpos, en los que se somete a ensayo la capacidad de los anticuerpos anti-VEGF de inhibir el efecto de los polipéptidos VEGF-E sobre células endoteliales u otras células utilizadas en los ensayos cardiovascular, endotelial y angiogénico. Entre los anticuerpos ejemplares se incluyen los anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describe posteriormente en la presente memoria.

**[0142]** Pueden llevarse a cabo estudios de ligamiento de anticuerpos siguiendo cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como los ensayos de unión competitiva, los ensayos directos e indirectos de sándwich y los ensayos de inmunoprecipitación (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* (CRC Press, Inc., 1987), páginas 143 a 158).

5 **[0143]** Los ensayos de unión competitiva se basa en la capacidad de un estándar marcado de competir con el analito de la muestra de ensayo para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se llega a unir a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que llega a unirse, los anticuerpos preferentemente se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el estándar y el analito que se encuentran unidos a los anticuerpos puedan separarse convenientemente del estándar y del analito que siguen sin unirse.

10 **[0144]** Los ensayos de sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno de los cuales es capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que debe detectarse. En un ensayo de sándwich, el analito de muestra de ensayo se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.376.110). El segundo anticuerpo mismo puede marcarse con un grupo detectable (ensayos sándwich directos) o puede medirse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con un grupo detectable (ensayos sándwich indirectos). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es un enzima.

15 **[0145]** Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

#### 4. Ensayos de tumores basados en células

20 **[0146]** Los ensayos basados en células y los modelos animales de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos, tales como los tumores, pueden utilizarse para verificar los resultados de un ensayo cardiovascular, endotelial y angiogénico de la presente invención, y adicionalmente para comprender la relación entre los genes identificados en la presente invención y el desarrollo y la patogénesis de crecimiento celular cardiovascular, endotelial y angiogénico no deseables. El papel de los productos génicos identificados en el desarrollo y la patología del crecimiento celular cardiovascular, endotelial y angiogénico no deseables, por ejemplo las células tumorales, puede someterse a ensayo mediante la utilización de células o líneas celulares que se ha identificado que resultan estimuladas o inhibidas por el polipéptido VEGF-E de la presente invención. Entre este tipo de células se incluyen, por ejemplo, aquéllas proporcionadas en los Ejemplos, posteriormente.

25 **[0147]** En un enfoque diferente, las células de un tipo celular que es conocido que se encuentran implicadas en un trastorno cardiovascular, endotelial y angiogénico particular se transfectan con los ADNc de la presente invención, y se analiza la capacidad de estos ADNc de inducir crecimiento excesivo o de inhibir el crecimiento. Si el trastorno cardiovascular, endotelial y angiogénico es cáncer, entre las células tumorales adecuadas se incluyen, por ejemplo, las líneas celulares tumorales estables, tales como la línea celular B104-1-1 (línea celular NIH-3T3 estable transfectada con el protooncogén neu) y células NIH-3T3 transfectadas por ras, que pueden transfectarse con el gen deseada y monitorizarse para el crecimiento tumorigénico. Dichas líneas celulares transfectadas seguidamente pueden utilizarse para someter a ensayo la capacidad de los anticuerpos policlonales o monoclonales o las composiciones de anticuerpos de inhibir el crecimiento celular tumorigénico, ejerciendo actividad citostática o citotóxica sobre el crecimiento de las células transformadas, o mediando en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en la presente invención pueden utilizarse además para identificar fármacos candidatos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos, tales como el cáncer.

30 **[0148]** Además, los cultivos primarios derivados de tumores en animales transgénicos (tal como se ha descrito anteriormente) pueden utilizarse en los ensayos basados en células de la presente invención, aunque resultan preferentes las líneas celulares estables. Las técnicas para derivar líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:642-648, 1985).

#### 5. Terapia génica

35 **[0149]** El polipéptido VEGF-E de la invención y los polipeptidil agonistas y antagonistas pueden utilizarse de acuerdo con la presente descripción mediante la expresión de dichos polipéptidos *in vivo*, lo que a menudo se denomina en la invención terapia génica.

40 **[0150]** Existen dos enfoques principales a la introducción de ácidos nucleicos (opcionalmente contenidos en un vector) en las células del paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, los ácidos nucleicos se inyectan directamente en el paciente, habitualmente en los sitios en que se requiere el polipéptido VEGF-E, es decir, el sitio de síntesis del polipéptido VEGF-E, en caso de ser conocido, y el sitio (por ejemplo la herida) en la que resulta necesaria la actividad biológica de polipéptido VEGF-E. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, se introducen los ácidos nucleicos en estas células aisladas, y las células modificadas se administran en el

paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.892.538 y nº 5.283.187).

**[0151]** Se dispone de una diversidad de técnicas para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere al interior de las células cultivadas *in vitro*, o si se transfiere *in vivo* al interior de las células del huésped deseado. Entre las técnicas adecuadas para la transferencia de ácidos nucleicos en células de mamífero *in vitro* se incluyen la utilización de liposomas, la electroporación, la microinyección, la transducción, la fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. La transducción implica la asociación de una partícula vírica recombinante (preferentemente retrovírica) defectiva en la replicación, con un receptor celular, seguido de la introducción en la célula de los ácidos nucleicos contenidos en la partícula. Un vector utilizado comúnmente para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

**[0152]** Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* preferentes en la actualidad incluyen la transfección con vectores víricos o no víricos (tales como adenovirus, lentivirus, virus del herpes simplex I o virus adenoasociados (AAV)) y sistemas basados en lípidos (son lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol; ver, por ejemplo, Tonkinson *et al.*, Cancer Investigation 14(1):54-65, 1996). Los vectores más preferentes para la utilización en terapia génica son los virus, más preferentemente los adenovirus, AAV, lentivirus o retrovirus. Un vector vírico, tal como un vector retrovírico, incluye por lo menos un promotor/intensificador de transcripción o uno o más elementos definidores de locus u otros elementos que controla la expresión génica por otros medios, tales como el procesamiento alternativo, la exportación de ARN nuclear o la modificación post-traducciona de mensajero. Además, un vector vírico, tal como un vector retrovírico, incluye una molécula de ácido nucleico que, al transcribirse en presencia de un gen codificante de polipéptido VEGF-E, se liga operablemente al mismo y actúa como secuencia de inicio de traducción. Estos constructos de vectores también incluyen una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTRs) o partes de las mismas, y sitios de unión de cebador de cadena positiva y negativa apropiados para los virus utilizados (si no se encuentran ya presentes en el vector vírico). Además, dicho vector típicamente incluye una secuencia de señal para la secreción del polipéptido VEGF-E desde una célula huésped en la que se encuentra situado. Preferentemente la secuencia de señal para este fin es una secuencia de señal de mamífero, más preferentemente la secuencia de señal nativa para el polipéptido VEGF-E. Opcionalmente, el constructo vector también puede incluir una señal que dirija la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de transducción. A título de ejemplo, dichos vectores típicamente incluyen una LTR 5', un sitio de unión de ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de ADN de segunda cadena y una LTR 3' o una parte de los mismos. Pueden utilizarse otros vectores que no son víricos, tales como lípidos catiónicos, polilisisina y dendrímeros.

**[0153]** En algunas situaciones, resulta deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que presenta su diana en las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína membranal de superficie celular o para la célula diana, un ligando de un receptor sobre la célula diana, etc. En el caso de que se utilicen liposomas, pueden utilizarse proteínas que se unen a la proteína membranal de superficie celular asociada a endocitosis para el reconocimiento y/o para facilitar la incorporación, por ejemplo proteínas de cápside o fragmentos de las mismas que son tóxicas para un tipo celular particular, anticuerpos de proteínas que experimentan internalización en el ciclo, y proteínas con diana localizada intracelularmente y que incrementan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, en Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987, y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414, 1990. Para una revisión de los protocolos conocidos en la actualidad de marcaje génico y de terapia génica, ver Anderson *et al.*, Science 256:808-813, 1992. Ver también la patente WO nº 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

**[0154]** Pueden encontrarse terapia génica adecuada y procedimientos para preparar partículas retrovíricas y proteínas estructurales, por ejemplo, en la patente US nº 5.681.746.

## 6. Use of Gene as Diagnostic

**[0155]** La presente invención también se refiere a la utilización del gen codificante del polipéptido VEGF-E como una herramienta diagnóstica. La detección de una forma mutada del polipéptido VEGF-E permitirá un diagnóstico de una enfermedad cardiovascular, endotelial y angiogénica, o una susceptibilidad a una enfermedad cardiovascular, endotelial y angiogénica, tal como un tumor, debido a que las mutaciones en el polipéptido VEGF-E pueden causar tumores.

**[0156]** Pueden detectarse individuos que portan mutaciones en el gen codificante del polipéptido VEGF-E humano a nivel del ADN mediante una diversidad de técnicas. Los ácidos nucleicos para el diagnóstico pueden obtenerse de las células de un paciente, por ejemplo de sangre, orina, saliva, de biopsia de tejido y de material de autopsia. El ADN genómico puede utilizarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente mediante la utilización de PCR (Saiki *et al.*, Nature 324:163-166, 1986) previamente al análisis. También puede utilizarse ARN o ADNc para el mismo fin. A título de ejemplo, los cebadores de PCR complementarios al ácido nucleico codificante del polipéptido VEGF-E pueden utilizarse para identificar y analizar las mutaciones del polipéptido VEGF-E. Por ejemplo, pueden detectarse deleciones e inserciones mediante un cambio de tamaño del producto amplificado comparado con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales pueden identificarse mediante hibridación de ADN amplificado a ARN marcado radioactivamente codificante del polipéptido VEGF-E, o alternativamente, secuencias de

ADN antisentido marcadas radioactivamente codificantes del polipéptido VEGF-E. Pueden distinguirse las secuencias perfectamente apareadas de los dúplex no apareados mediante digestión con ARNasa o por diferentes en las temperaturas de fusión.

5 **[0157]** El ensayo genético basado en diferencias en la secuencia de ADN puede conseguirse mediante la detección de alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles con o sin agentes desnaturalizantes. Pueden visualizarse deleciones e inserciones pequeñas en la secuencia mediante electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de diferentes fragmentos pueden distinguirse en geles desnaturalizantes en gradiente de formamidina en los que las movilidades de diferentes fragmentos de ADN se retrasan en el gel en diferentes posiciones según sus temperaturas específicas de fusión o de fusión parcial (ver, por ejemplo, Myers *et al.*, Science 230:1242, 1985).

**[0158]** Los cambios de secuencia en localizaciones específicas también pueden revelarse mediante ensayos de protección frente a nucleasa, tales como la protección frente a ARNasa y a S1, o el procedimiento de corte químico, por ejemplo Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401, 1985.

15 **[0159]** De esta manera, la detección de una secuencia específica de ADN puede conseguirse mediante procedimientos tales como la hibridación, la protección frente a ARNasa, el corte químico, la secuenciación directa del ADN, o la utilización de enzimas de restricción, por ejemplo los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la transferencia southern del ADN genómico.

#### 7. Utilización para detectar los niveles de polipéptido VEGF-E

20 **[0160]** Además de las más convencionales electroforesis en gel y secuenciación de ADN, las mutaciones también pueden detectarse mediante análisis *in situ*.

25 **[0161]** La expresión del polipéptido VEGF-E puede relacionarse con enfermedad vascular o neovascularización asociada a la formación de tumores. Si el polipéptido VEGF-E presenta una secuencia de señal y el ARNm presenta un elevado nivel de expresión en las células endoteliales y en menor grado en células de músculo liso, ello indica que el polipéptido VEGF-E se encuentra presente en el suero. Por consiguiente, podría utilizarse un anticuerpo anti-polipéptido VEGF-E para diagnosticar enfermedad vascular o neovascularización asociada a la formación de tumor, debido a que un nivel alterado de este polipéptido VEGF-E podría ser indicativo de dichos trastornos.

30 **[0162]** Podría utilizarse un ensayo de competición en el que los anticuerpos específicos para el polipéptido VEGF-E se uniesen a un soporte sólido y a polipéptido VEGF-E marcado y se pasase una muestra derivada del huésped sobre el soporte sólido, correlacionando la cantidad de marcaje detectada unida al soporte sólido con la cantidad de polipéptido VEGF-E en la muestra.

#### 8. Sondas e inmunoensayos

**[0163]** Las secuencias variantes de aminoácidos de VEGF-E y derivados que presentan reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos cultivados contra VEGF nativo resultan útiles en inmunoensayos para VEGF-E a modo de estándares o, en caso de encontrarse marcados, como reactivos competitivos.

35 **[0164]** La secuencia de nucleótidos de longitud completa SEC ID nº 1, o partes de la misma, puede utilizarse como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el gen de VEGF-E de longitud completa o para aislar todavía otros genes (por ejemplo aquellos codificantes de variantes naturales de VEGF-E o VEGF-E de otras especies) que presentan una identidad de secuencia deseada con la secuencia de VEGF-E dada a conocer en la figura 1 (SEC ID nº 1). Opcionalmente, la longitud de las sondas se encuentra comprendida entre aproximadamente 40 **[0164]** 17 y aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1, tal como se muestra en la figura 1, o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos intensificadores e intrones de ADN codificante de VEGF-E de secuencia nativa. A título de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen de VEGF-E utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse con una diversidad de marcajes, incluyendo radionucleótidos, tales como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S, o marcajes enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que presentan una secuencia complementaria a la del gen de VEGF-E de la presente invención pueden utilizarse para cribar bibliotecas de ADNc humano, de ADN genómico o de ARNm para determinar con qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen en más detalle en los Ejemplos, posteriormente.

**[0165]** Las sondas también pueden utilizarse en técnicas de PCR para generar un pool de secuencias para la identificación de secuencias de VEGF-E estrechamente relacionadas.

#### 9. Mapado de cromosomas

55 **[0166]** Las secuencias de nucleótidos codificantes de un polipéptido VEGF-E también pueden utilizarse para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica el polipéptido VEGF-E y para el análisis genético de

individuos con trastornos genéticos. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la presente invención puede maparse al cromosoma y a regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como la hibridación *in situ*, el análisis de ligamientos frente a marcadores cromosómicos conocidos y el cribado de hibridación con bibliotecas.

5 **[0167]** Para la identificación de cromosomas, la secuencia se dirige específicamente y puede hibridarse con una localización particular en un cromosoma humano individual. Además, en la actualidad existe una necesidad de identificar sitios particulares en el cromosoma. En la actualidad se encuentran disponibles para marcar la localización cromosómica pocos reactivos marcadores de cromosomas basados en datos reales de secuencias (polimorfismos de repetición). El mapado de ADN a cromosomas según la presente invención resulta importante para correlacionar aquellas secuencias a genes asociados a enfermedad. Brevemente, las secuencias pueden maparse a cromosomas mediante la preparación de cebadores de PCR (preferentemente de 15 a 25 pb) a partir del ADNc. El análisis informático de la región 3' no traducida se utiliza para seleccionar rápidamente cebadores que no abarquen más de un exón en el ADN genómico, complicando de esta manera el procedimiento de amplificación. A continuación, estos cebadores se utilizan para el cribado por PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Únicamente aquellos híbridos que contienen el gen humano correspondiente al cebador rendirán un fragmento amplificado.

10 **[0168]** El mapado por PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar un ADN particular a un cromosoma particular. Utilizando la presente invención con los mismos cebadores oligonucleótidos, la sublocalización puede conseguirse con paneles de fragmentos procedentes de cromosomas específicos o de pools de clones genómicos grandes de manera análoga. Otras estrategias de mapado que de manera similar pueden utilizarse para mapar a su cromosoma incluyen la hibridación *in situ*, el precibado con cromosomas marcados separados por flujo, y la preselección mediante hibridación para construir bibliotecas de ADNc específicas de cromosomas.

20 **[0169]** La hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) de un clon de ADNc con una extensión cromosómica en metafase puede utilizarse para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica puede utilizarse con ADNc de tan solo 500 ó 600 bases; sin embargo, los clones mayores de 2.000 pb presentan una probabilidad más elevada de unión a una única localización cromosómica con suficiente intensidad de señal para la simple detección. FISH requiere la utilización de los clones a partir de los que se derivó el gen codificante del polipéptido VEGF-E, resultando mejores los clones más largos. Por ejemplo, 2.000 pb es bueno, 4.000 pb es mejor y más de 4.000 probablemente no resulta necesario para obtener buenos resultados en un porcentaje razonable del tiempo. Para una revisión de esta técnica, ver Verma *et al.*, Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988).

25 **[0170]** Tras mapar una secuencia a una localización cromosómica precisa, puede correlacionarse la posición física de la secuencia en el cromosoma con datos de mapa genético. Dichos datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man* (disponible en internet a través de la John Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades que han sido mapadas en la misma región cromosómica seguidamente se identifica mediante análisis de ligamiento (coherencia de genes físicamente contiguos).

30 **[0171]** A continuación, resulta necesario determinar las diferencias en la secuencia de ADNc o genómica entre individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o en todos los individuos afectados pero no en cualquier individuo normal, la mutación es probable que sea el agente causativo de la enfermedad.

35 **[0172]** Con la resolución actual del mapado físico y las técnicas de mapado genético, un ADNc localizado precisamente en una región cromosómica asociada con la enfermedad podría ser uno de entre 50 y 500 genes causativos potenciales (lo anterior supone una resolución de mapado de 1 megabase y un gen por cada 20 kb).

#### 10. Ensayos de cribado para fármacos candidatos

45 **[0173]** Pueden diseñarse ensayos de cribado para encontrar compuestos líder que imiten la actividad biológica de un VEGF-E nativo o un receptor de VEGF-E. Entre estos ensayos de cribado se incluyen ensayos en los que puede aplicarse el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciendo que resulten particularmente adecuadas para la identificación de fármacos candidatos de molécula pequeña. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos. Los ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que se encuentran bien caracterizados en la técnica.

50 **[0174]** Por lo tanto, la presente invención comprende procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquellos que imitan el polipéptido VEGF-E (agonistas) o evitan el efecto del polipéptido VEGF-E (antagonistas). Los ensayos de cribado de fármacos antagonistas candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen o se acomplejan con los polipéptidos VEGF-E codificados por los genes identificados en la presente invención, o que de otra manera interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Entre estos ensayos de cribado se incluyen ensayos en los que puede aplicarse el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciendo que resulten particularmente adecuados para la identificación de fármacos candidatos de

molécula pequeña.

**[0175]** Los ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, los ensayos de cribado bioquímico, los inmunoensayos y los ensayos basados en células, que se encuentran bien caracterizados en la técnica.

5 **[0176]** Todos los ensayos para antagonistas son comunes en el aspecto de que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido VEGF-E codificado por un ácido nucleico identificado en la presente invención bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

10 **[0177]** En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido VEGF-E codificado por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo sobre una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se consigue mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido VEGF-E y el secado. Alternativamente, puede utilizarse para anclarlo a una superficie sólida un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido VEGF-E que debe inmovilizarse. El ensayo se lleva a cabo mediante la adición del componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcaje detectable, con el componente inmovilizado, por ejemplo la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Tras completar la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo mediante lavado, y los complejos anclados sobre la superficie sólida se detectan. En el caso de que el componente originalmente no inmovilizado porte un marcaje detectable, la detección del marcaje inmovilizado sobre la superficie indica que se ha producido el acomplejamiento. En el caso de que el componente originalmente no inmovilizado no porte un marcaje, puede detectarse el acomplejamiento por ejemplo mediante la utilización de un anticuerpo marcado que se una específicamente al complejo inmovilizado.

25 **[0178]** Si el compuesto candidato interactúa, aun que sin unirse, con un polipéptido VEGF-E particular codificado por un gen identificado en la presente invención, su interacción con dicho polipéptido puede someterse a ensayo mediante procedimientos bien conocidos para la detección de interacciones proteína-proteína. Entre dichos ensayos se incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación y la copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína puede monitorizarse mediante la utilización de un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London)340:245-246, 1989; Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582, 1991), tal como da a conocer Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5789-5793, 1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como el GAL4, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, funcionando el otro como el dominio de activación transcripcional. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriormente indicadas (generalmente denominado el "sistema de dos híbridos") aprovecha dicha propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona con el dominio de unión a ADN de GAL4, y el otro, en el que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante una interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interaccionantes se detectan con un sustrato cromogénico para la  $\beta$ -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de los dos híbridos se encuentra disponible comercialmente de Clontech. Este sistema también puede extenderse al mapeo de dominios de proteína implicados en interacciones específicas de proteínas, así como a la identificación de residuos aminoácidos que resulten cruciales para estas interacciones.

45 **[0179]** Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen codificante de un polipéptido VEGF-E identificado en la presente invención y otros componentes intracelulares o extracelulares puede someterse a ensayo de la manera siguiente: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intracelular o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permite que se produzcan la interacción y la unión de los dos productos. Con el fin de someter a ensayo la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, que sirve como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intracelular o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su pareja de reacción.

55 **[0180]** Si el polipéptido VEGF-E presenta la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales en presencia del comitígeno ConA, un ejemplo de un procedimiento de cribado aprovecha esta capacidad. Específicamente, en el ensayo de proliferación, se obtienen células endoteliales de vena umbilical humana y se cultivan en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) y se suplementan con una mezcla de reacción apropiada para facilitar la proliferación de las células, conteniendo la mezcla Con-A (Calbiochem, La Jolla, CA). Se añaden con-A y el compuesto que debe cribarse y tras la incubación a 37°C, los cultivos reciben un pulso de <sup>3</sup>H-timidina y se recolectan sobre filtros de fibra de vidrio (pH; Cambridge Technology, Watertown, MA). Se

60

determina la incorporación media (cpm) de  $^3\text{(H)}$ -timidina de cultivos por triplicado utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Irvine, CA). La incorporación significativa de  $^3\text{(H)}$ -timidina indica la estimulación de la proliferación de células endoteliales.

5 **[0181]** Para el ensayo para antagonistas, se lleva a cabo el ensayo descrito anteriormente; sin embargo, en este ensayo se añade el polipéptido VEGF-E conjuntamente con el compuesto que debe cribarse y la capacidad del compuesto de inhibir la incorporación de  $^3\text{(H)}$ -timidina en presencia del polipéptido VEGF-E indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido VEGF-E. Alternativamente, pueden detectarse antagonistas mediante la combinación del polipéptido VEGF-E y un antagonista potencial con receptores de polipéptido VEGF-E unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido VEGF-E puede marcarse, tal como con radioactividad, de manera que el número de moléculas de polipéptido VEGF-E unidas al receptor puede utilizarse para determinar la efectividad del antagonista potencial. El gen codificante del receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo el reconocimiento y selección ("panning") de ligandos y la separación por FACS (Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun. 1(2): capítulo 5, 1991). Preferentemente, se utiliza la clonación de expresión, en la que se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula que responde al polipéptido VEGF-E y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en pools y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no responden al polipéptido VEGF-E. Las células transfectadas que se cultivan sobre portaobjetos de vidrio se exponen a polipéptido VEGF-E marcado. El polipéptido VEGF-E puede marcarse mediante una diversidad de medios, incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinas específica de sitio. 10 Tras la fijación y la incubación, los portaobjetos se someten a análisis autoradiográfico. Se identifican los pools positivos y se preparan sub-pools y se transfectan nuevamente utilizando un procedimiento interactivo de sub-pooling y nuevo cribado, rindiendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

15 **[0182]** Como enfoque alternativo para la identificación de receptores, puede unirse por fotoafinidad polipéptido VEGF-E marcado a membrana celular o a preparaciones de extracto que expresan la molécula de receptor. El material entrecruzado se resuelve mediante PAGE y se expone a película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede extraerse, resolverse en fragmentos péptidos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida de la microsecuenciación se utiliza para diseñar un conjunto de sondas oligonucleótidas degeneradas para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen codificante del receptor putativo.

20 **[0183]** En otro ensayo para antagonistas, se incuban con polipéptido VEGF-E marcado en presencia del compuesto candidato, células de mamífero o una preparación de membranas que expresan el receptor. Seguidamente puede medirse la capacidad del compuesto de incrementar o de bloquear esta interacción. La composición útil en el tratamiento de los trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos, moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y de ribozima, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad del producto génico diana.

25 **[0184]** Entre los ejemplos más específicos de potenciales antagonistas se incluyen un oligonucleótido que se une al polipéptido VEGF-E, fusiones de (poli)péptido inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una única cadena, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial podría ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo una forma mutada del polipéptido VEGF-E que reconoce el receptor pero que no imparte efecto, inhibiendo competitivamente de esta manera la acción del polipéptido VEGF-E.

30 **[0185]** Otro antagonista potencial del polipéptido VEGF-E es un constructo de ARN o ADN antisentido preparado utilizando tecnología antisentido, en el que, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm hibridándose a ARNm diana y evitando la traducción en proteína. Puede utilizarse la tecnología antisentido para controlar la expresión génica mediante la formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, basándose ambos procedimientos en la unión de un polinucleótido a ADN o a ARN. Por ejemplo, la parte 5' codificante de la secuencia polinucleótida, que codifica los polipéptidos VEGF-E maduros de la presente invención, se utiliza para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de longitud comprendida entre 35 aproximadamente 10 y 40 pares de bases. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que resulte complementario a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice, ver Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. 6:3073, 1979; Cooney *et al.*, Science 241:456, 1988; Dervan *et al.*, Science 251:1360, 1991, previniendo de esta manera la transcripción y la producción del polipéptido VEGF-E. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en polipéptido VEGF-E (antisentido; Okano, Neurochem. 56:560, 1991; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos indicados anteriormente también pueden administrarse en células de manera que el ARN o ADN antisentido se exprese *in vivo*, inhibiendo la producción del polipéptido VEGF-E. En el caso de que se utilice ADN antisentido, resultan preferentes los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de traducción, por ejemplo entre las posiciones aproximadas -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

40 **[0186]** Entre los antagonistas potenciales se incluyen moléculas pequeñas se unen al sitio activo, el sitio de unión de receptor o el factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido VEGF-E, bloqueando de esta

manera la actividad biológica normal del polipéptido VEGF-E. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, péptidos pequeños o moléculas de tipo péptido, preferentemente péptidos solubles y compuestos no peptídico sintéticos orgánico o inorgánicos.

5 **[0187]** Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar el corte específico de ARN. Los ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguida del corte endonucleolítico. Pueden identificarse mediante técnicas conocidas sitios de corte de ribozima específicos dentro de una diana de ARN potencial. Para detalles adicionales ver, por ejemplo, Rossi, Current Biology 4:469-471, 1994, y la publicación de patente PCT nº WO97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

10 **[0188]** Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deben ser de una única cadena y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que facilite la formación de triple hélice según reglas de Hoogsteen de apareamiento de bases, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para detalles adicionales ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT nº WO97/33551, *supra*.

15 **[0189]** Dichas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante cualquiera o cualesquiera de los ensayos de cribado comentados anteriormente en la presente memoria y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la materia.

#### 11. Tipos de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos que debe tratarse

20 **[0190]** Los polipéptidos VEGF-E, o agonistas o antagonistas de los mismos, que presentan actividad en los ensayos cardiovascular, angiogénico y endotelial descritos en la presente invención, y/o el producto génico de los cuales se ha encontrado que está localizado en el sistema cardiovascular, es probable que presenten usos terapéuticos en una diversidad de trastornos cardiovascular, endotelial y angiogénico, incluyendo los trastornos sistémicos que afectan a los vasos, tales como la diabetes mellitus. Las moléculas de VEGF-E de la presente invención presentan varios usos terapéuticos asociados a la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de las células. Entre dichos usos se incluyen el tratamiento de células endoteliales de la vena umbilical, en vista de la capacidad de mostrada del VEGF-E de incrementar la supervivencia de las células endoteliales de la vena umbilical humana. El tratamiento puede resultar necesario si la vena se ve sometida a traumatismos o a situaciones en las que se utilizan medios artificiales para incrementar la supervivencia de la vena umbilical, por ejemplo en el caso de que sea débil, se encuentre enferma, basados en una matriz artificial o en un ambiente artificial. Otras condiciones fisiológicas que podrían mejorarse basándose en el carácter mitogénico selectivo del VEGF-E también se encuentran comprendidas dentro de la presente invención. Entre los usos también se incluyen el tratamiento de fibroblastos y miocitos, en vista de la capacidad demostrada del VEGF-E de inducir la proliferación de fibroblastos y la hipertrofia en miocitos. En particular, VEGF-E puede utilizarse en la cicatrización de heridas, el crecimiento de tejidos y la generación y regeneración de músculo.

35 **[0191]** La utilidad terapéutica de los mismos podría incluir enfermedades de las arterias, capilares, venas y/o vasos linfáticos. Entre los ejemplos de los tratamientos comentados posteriormente en la presente memoria se incluyen tratar la enfermedad de desgaste muscular, el tratamiento de la osteoporosis, la ayuda a la fijación de implantes para estimular el crecimiento de células en torno al implante y que por lo tanto facilitan su unión al sitio pretendido, incrementado la estabilidad de IGF en tejidos o en el suero, en su caso, e incrementar la unión del receptor IGF (debido a que se ha demostrado *in vivo* que IGF incrementa el crecimiento de células eritroides medulares y progenitoras granulocíticas humanas).

40 **[0192]** Los polipéptidos VEGF-E o agonistas o antagonistas de los mismos también pueden utilizarse para estimular la eritropoyesis o granulopoyesis, para estimular la cicatrización de heridas o la regeneración de tejidos y terapias asociadas centradas en la regeneración de tejido, tal como tejido conectivo, piel, hueso, cartilago, músculo, pulmón o riñón, para promover la angiogénesis, para estimular o inhibir la migración de células endoteliales y para proliferar el crecimiento de músculo liso vascular y la producción de células endoteliales. El incremento de la angiogénesis mediada por el polipéptido VEGF-E o su antagonista resultaría beneficioso para los tejidos isquémicos y para el desarrollo coronario colateral en el corazón secundario a la estenosis coronaria. Se utilizan antagonistas para inhibir la acción de dichos polipéptidos, por ejemplo para limitar la producción de tejido conectivo excesivo durante la cicatrización de heridas o la fibrosis pulmonar si el polipéptido VEGF-E estimula dicha producción. Lo anterior incluye el tratamiento del infarto agudo de miocardio y la insuficiencia cardíaca.

45 **[0193]** Además, la presente invención se refiere al tratamiento de la hipertrofia cardíaca, con independencia de la causa subyacente, mediante la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de polipéptido VEGF-E, o agonista o antagonista del mismo. Si el objetivo es el tratamiento de pacientes humanos, el polipéptido VEGF-E preferentemente es polipéptido VEGF-E recombinante humano (polipéptido VEGF-Erh). El tratamiento de la hipertrofia cardíaca puede llevarse a cabo en cualquiera de entre diversas etapas, que pueden resultar de una diversidad de condiciones patológicas diversas, incluyendo el infarto de miocardio, la hipertensión, la cardiomiopatía hipertrofica y la regurgitación valvular. El tratamiento se extiende a todas las etapas de la progresión de la hipertrofia cardíaca, con o sin daño estructural del músculo cardíaco, con independencia del trastorno cardíaco subyacente.

5 **[0194]** La decisión de utilizar la molécula misma o un agonista de la misma para cualquier indicación particular, y no un antagonista de la molécula, dependerá principalmente de si la molécula de la presente invención estimula la cardiovascularización, la génesis de células endoteliales o la angiogénesis, o inhibe estas condiciones. Por ejemplo, si la molécula estimula la angiogénesis, un antagonista de la misma resultaría útil para el tratamiento de trastornos en los que se desea limitar o evitar la angiogénesis. Entre los ejemplos de dichos trastornos se incluyen tumores vasculares, tales como hemangioma, angiogénesis tumoral, neovascularización en la retina, en el corioide o en la córnea, asociada a neuropatía diabética o a retinopatía infantil prematura o a degeneración macular y vitreoretinopatía proliferativa, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, hiperestimulación ovárica, soriasis, endometriosis asociada a neovascularización, restenosis secundaria a angioplastia con balón, sobreproducción de tejido cicatrizal, por ejemplo el observado en un queloide formado tras la cirugía, la fibrosis tras el infarto de miocardio o las lesiones fibróticas asociadas a la fibrosis pulmonar.

**[0195]** Sin embargo, si la molécula inhibe la angiogénesis, previsiblemente se utilizaría directamente para el tratamiento de las condiciones anteriormente indicadas.

15 **[0196]** Por otra parte, si la molécula estimula la angiogénesis, se utilizaría ella misma (o un agonista de la misma) para indicaciones en las que se desea la angiogénesis, tales como la enfermedad vascular periférica, la hipertensión, la vasculitides inflamatoria, la enfermedad de Reynaud y el fenómeno de Reynaud, los aneurismas, la restenosis arterial, la tromboflebitis, la linfangitis, el linfedema, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, el daño por reperfusión isquémica, la angina, los infartos de miocardio, tales como los infartos agudos de miocardio, las condiciones cardíacas crónicas, la insuficiencia cardíaca, tal como la insuficiencia cardíaca congestiva y la osteoporosis.

20 **[0197]** A continuación se describen tipos específicos de enfermedad en los que el polipéptido VEGF-E de la presente invención o antagonistas del mismo pueden resultar útiles para el direccionamiento de fármacos de tipo vascular o como dianas terapéuticas para el tratamiento o la prevención de los trastornos. La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por la acumulación de placas de engrosamiento intimal en las arterias, debido a la acumulación de lípidos, la proliferación de células de músculo liso y la formación de tejido fibroso dentro de la pared arterial. La enfermedad puede afectar a arterias grandes, medianas y pequeñas en cualquier órgano. Los cambios de función celular en músculo liso endotelial y vascular es conocido que desempeñan un papel importante en la modulación de la acumulación y la regresión de estas placas.

25 **[0198]** La hipertensión se caracteriza por una presión vascular incrementada en los sistemas arterial sistémico, arterial pulmonar o venoso portal. La presión elevada puede resultar de una función endotelial alterada y/o de enfermedad vascular o resultar en las mismas.

30 **[0199]** Entre las vasculitides inflamatorias se incluyen la arteritis de células gigantes, la arteritis de Takayasu, la poliarteritis nodosa (incluyendo la forma microangiopática), la enfermedad de Kawasaki, la poliangeitis microscópica, la granulomatosis de Wegener y una diversidad de trastornos vasculares de tipo infeccioso (incluyendo la púrpura de Henoch-Schonlein). Se ha demostrado que la función celular endotelial alterada resulta importante en estas enfermedades.

35 **[0200]** La enfermedad de Reynaud y el fenómeno de Reynaud se caracterizan por la alteración anormal intermitente de la circulación por las extremidades con la exposición al frío. Se ha demostrado que la alteración de la función de las células endoteliales es importante en esta enfermedad.

40 **[0201]** Los aneurismas son dilataciones saculares o fusiformes del árbol arterial o venoso que se asocian a alteraciones de células endoteliales y/o de músculo liso vascular.

**[0202]** La restenosis arterial (restenosis de la pared arterial) puede producirse tras la angioplastia como resultado de la alteración de la función y la proliferación de las células de músculo liso endotelial y vascular.

45 **[0203]** La tromboflebitis y la linfangitis son trastornos inflamatorios de venas y vasos linfáticos, respectivamente, que pueden resultar de alteraciones de la función celular endotelial o producir las mismas. De manera similar, el linfedema es una condición que implica la alteración de los vasos linfáticos resultante de la función celular endotelial.

50 **[0204]** La familia de los tumores vasculares benignos y malignos se caracteriza por la proliferación y crecimiento anormales de elementos celulares del sistema vascular. Por ejemplo, los linfangiomas son tumores benignos del sistema linfático que son malformaciones congénitas, con frecuencia quísticas, de los vasos linfáticos que habitualmente se producen en neonatos. Los tumores quísticos tienden a crecer adentrándose en el tejido circundante. Los tumores quísticos habitualmente se producen en la región cervical y axilar. También pueden producirse en tejidos blandos de las extremidades. Los síntomas principales son vasos linfáticos estructurados dilatados, en ocasiones reticulares, y linfoquistes circundados por tejido conectivo. Se cree que los linfangiomas están causados por vasos linfáticos embrionarios incorrectamente conectados o ausentes. La consecuencia es un drenaje linfático localmente alterado (Griener *et al.*, *Lymphology* 4:140-144, 1971).

55 **[0205]** Otra utilización para los polipéptidos VEGF-E de la presente invención o antagonistas de los mismos está en la prevención de la angiogénesis tumoral, que implica la vascularización de un tumor, lo que permite que crezca y/o

5 se metastatice. Este proceso depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Entre los ejemplos de neoplasmas y condiciones relacionadas que implica la angiogénesis tumoral se incluyen carcinomas mamarios, carcinomas pulmonares, carcinomas gástricos, carcinomas esofágicas, carcinomas colorrectales, carcinomas hepáticas, carcinomas ováricos, teomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicales, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cuello de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas del páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas del tiroides, tumor de Wilm, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, proliferación vascular anormal asociada a facomatosis, edema (tal como el asociada a tumores cerebrales) y síndrome de Meigs.

10  
15 **[0206]** La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal de pérdida visual severa en la población de edad avanzada. La forma exudativa de la AMD se caracteriza por la neovascularización coroidal y el desprendimiento de células epiteliales pigmentarias de la retina. Debido a que la neovascularización coroidal se asocia a un empeoramiento drástico del pronóstico, los polipéptidos VEGF-E o antagonista de los mismos, se prevé que resulte útil para reducir la severidad de la AMD.

20 **[0207]** La curación de traumatismos, tal como la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos también es un uso diana para los polipéptidos VEGF-E de la presente invención o antagonistas de los mismos. La formación y regresión de nuevos vasos sanguíneos resulta esencial para la cicatrización y reparación de los tejidos. En esta categoría se incluyen el crecimiento y regeneración de hueso, cartílago, tendón, ligamento y/o tejido nervioso, así como la cicatrización de heridas y la reparación y sustitución de tejidos, y en el tratamiento de quemaduras, incisiones y úlceras. Un polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo que induzca el crecimiento de cartílago y/o de hueso en circunstancias en las que el hueso no se forma normalmente resulta de aplicación en la cicatrización de fracturas óseas y de daños o defectos al cartílago en seres humanos y en otros animales. Este tipo de preparación, utilizando un polipéptido VEGF-E o un antagonista del mismo, podría presentar un uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas, así como abiertas, y también en la mejora de la fijación de las articulaciones artificiales. La formación de novo de hueso inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo, oncológicos o inducidos por resección, y también resulta útil en la cirugía plástica cosmética.

30 **[0208]** Los polipéptidos VEGF-E o antagonistas de los mismos también pueden resultar útiles para estimular un cierre mejor o más rápido de heridas que no cicatrizan, incluyendo, aunque sin limitación, úlceras por presión, úlceras asociadas a insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y traumáticas, y similares.

35 **[0209]** Se prevé que un polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo también pueda mostrar actividad para la generación o regeneración de otros tejidos, tales como órganos (incluyendo, por ejemplo páncreas, hígado, intestino, riñón, piel o endotelio), músculo (liso, esquelético o cardíaco) y tejido vascular (incluyendo el endotelio vascular), o para estimular el crecimiento de las células que comprenden dichos tejidos. Parte de los efectos deseados pueden ser por inhibición o modulación de la cicatrización fibrótica, permitiendo la regeneración del tejido normal.

40 **[0210]** Un polipéptido VEGF-E de la presente invención o un antagonista del mismo también puede resultar útil para la protección o regeneración del tracto digestivo, y para el tratamiento de fibrosis pulmonares o hepáticas, el daño por reperfusión en diversos tejidos, y de condiciones resultantes del daño sistémico por citoquinas. Además, el polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo puede resultar útil para estimular o inhibir la diferenciación de los tejidos indicados anteriormente a partir de tejidos o células precursoras, o para inhibir el crecimiento de los tejidos indicados anteriormente.

45 **[0211]** Un polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo también puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades periodontales y en otros procesos de reparación de tejidos. Dichos agentes pueden proporcionar un ambiente que atraiga las células formadoras de hueso, que estimule el crecimiento de las células formadoras de hueso o que induzca la diferenciación de las progenitoras de las células formadoras de hueso. Un polipéptido VEGF-E de la presente invención o un antagonista del mismo también puede resultar útil en el tratamiento de la osteoporosis o de la osteoartritis, tal como mediante la estimulación de la reparación de hueso y/o cartílago o mediante el bloqueo de la inflamación o de los procesos de destrucción de tejidos (actividad de colagenasa, actividad de osteoclastos, etc.) mediados por procesos inflamatorios, debido a que los vasos sanguíneos desempeñan un papel importante en la regulación de la renovación y crecimiento óseos.

50  
55 **[0212]** Otra categoría de actividad de regeneración de tejidos que puede atribuirse al polipéptido VEGF-E de la presente invención o a un antagonista del mismo es la formación de tendón/ligamento. Una proteína que induce la formación de tejido de tendón/de tipo ligamento u otro tejido en circunstancias en las que dicho tejido no se forma, normalmente resulta aplicable a la cicatrización de roturas de tendón o de ligamento, en deformidades y en otros defectos de tendones o ligamentos en seres humanos y en otros animales. Este tipo de preparación puede presentar un uso profiláctico en la prevención de daños al tejido de tendones o ligamentos, así como la utilización en la mejora de la fijación de tendón o ligamento a hueso o a otros tejidos, y en la reparación de defectos en tejido de tendón o

ligamento. La formación de novo de tejido de tendón/de tipo ligamento inducida por una composición del polipéptido VEGF-E de la presente invención o de un antagonista del mismo contribuye a la reparación de defectos congénitos, inducidos por traumatismo o defectos de tendón o ligamento de otro origen, y también resulta útil en cirugía plástica cosmética para la unión o reparación de tendones o de ligamentos. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionar un ambiente para atraer las células formadoras de tendón o de ligamento, para estimular el crecimiento de células formadoras de tendón o de ligamento, para inducir la diferenciación de progenitoras de células formadoras de tendón o de ligamento, para estimular el crecimiento de células de tendón, ligamento o progenitoras *ex vivo* para la introducción *in vivo* para llevar a cabo la reparación de tejidos. Las composiciones de la presente invención también pueden resultar útiles en el tratamiento de la tendinitis, el síndrome del túnel carpiano y otros defectos de tendones o ligamentos. Las composiciones también pueden incluir una matriz apropiada y/o el secuestro de agente a modo de portador, como es bien conocido de la técnica.

**[0213]** El polipéptido VEGF-E o su antagonista también puede resultar útil para la proliferación de células neurales y para la regeneración de tejido nervioso y cerebral, es decir, para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y periférico y de neuropatías, así como de trastornos mecánicos y traumáticos, que implican la degeneración, la muerte o traumatismos a células neurales o a tejido nervioso. Más específicamente, puede utilizarse un polipéptido VEGF-E o su antagonista en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso periférico, tal como lesiones de nervios periféricos, neuropatía periférica y neuropatías localizadas, y enfermedades del sistema nervioso central, tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y síndrome de Shy-Drger. Entre las condiciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención se incluyen trastornos mecánicos y traumáticos, tales como trastornos de la médula espinal, traumatismos en la cabeza y enfermedades cerebrovasculares, tales como ictus. Las neuropatías periféricas resultantes de quimioterapia o de otras terapias médicas también podrían ser tratables utilizando el polipéptido VEGF-E de la presente invención o un antagonista del mismo.

**[0214]** La lesión de isquemia-reperfusión es otra indicación. La disfunción de las células endoteliales puede resultar importante tanto en el inicio como en la regulación de las secuelas de sucesos que se producen tras la lesión de isquemia-reperfusión.

**[0215]** La artritis reumatoide es una indicación adicional. El crecimiento de vasos sanguíneos y el transporte de células inflamatorias por la vasculatura es un componente importante en la patogénesis de las formas reumatoide y seronegativa de la artritis.

**[0216]** El polipéptido VEGF-E o su antagonista también pueden administrarse profilácticamente en pacientes con hipertrofia cardíaca, para prevenir la progresión de la condición y evitar la muerte súbita, incluyendo la muerte de pacientes asintomáticos. Dicha terapia preventiva resulta particularmente conveniente en el caso de pacientes diagnosticados con hipertrofia cardíaca ventricular izquierda masiva (un grosor máximo de la pared de 35 mm o más en adultos, o un valor comparable en niños), o en casos en los que la carga hemodinámica del corazón resulta particularmente grande.

**[0217]** El polipéptido VEGF-E o su antagonista también puede resultar útil en el control de la fibrilación auricular, que se desarrolla en una parte sustancial de pacientes diagnosticados de cardiomiopatía hipertrófica.

**[0218]** Entre las indicaciones adicionales se incluyen la angina, los infartos de miocardio, tales como los infartos de miocardio agudos y la insuficiencia cardíaca, tal como la insuficiencia cardíaca congestiva. Entre las condiciones no neoplásicas adicionales se incluyen soriasis, retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas, incluyendo la retinopatía de prematuros, la fibroplasia retrolenta, el glaucoma neovascular, las hiperplasias del tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave), el trasplante corneal y de otros tejidos, la inflamación crónica, la inflamación pulmonar, el síndrome nefrótico, la preeclampsia, la ascites, la efusión pericárdica (tal como la asociada a la pericarditis) y la efusión pleural.

**[0219]** En vista de lo anteriormente indicado, los polipéptidos VEGF-E o agonistas o antagonistas de los mismos indicados en la presente invención, que se ha demostrado que alteran o impactan la función, proliferación y/o forma de las células endoteliales, es probable que desempeñen un papel importante en la etiología y en la patogénesis de muchos o de todos los trastornos indicados anteriormente, y de esta manera pueden servir como dianas terapéuticas para incrementar o inhibir estos procesos o para el direccionamiento de fármacos de tipo vascular en dichos trastornos.

## 12. Protocolos de administración, programas, dosis y formulaciones

**[0220]** Las moléculas de la presente invención y los agonistas y antagonistas de las mismas resultan farmacéuticamente útiles como agentes profilácticos y terapéuticos para diversos trastornos y enfermedades, tal como se ha indicado anteriormente.

**[0221]** El VEGF-E de la presente invención puede formularse según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que el VEGF-E de la presente invención se combina en mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos portadores adecuados y la formulación de los mismos, incluyendo de otras proteínas humanas, por ejemplo la albúmina sérica humana, se describen, por ejemplo,

en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo *et al.* El VEGF-E de la presente invención puede administrarse parenteralmente a sujetos que sufren enfermedades o condiciones cardiovasculares, o mediante otros procedimientos que garantizan su transporte hasta el flujo sanguíneo en una forma eficaz.

5 **[0222]** Entre las composiciones particularmente adecuadas para la administración clínica de VEGF-E de la presente invención utilizadas en la práctica de la misma se incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas estériles o polvos hidratable estériles, tales como proteína liofilizada. Resulta generalmente deseable incluir además en la formulación una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable, generalmente en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea isotónica. Típicamente también se incluyen un regulador del pH, tal como base arginina y ácido fosfórico, en cantidades suficientes para mantener un pH apropiado, generalmente entre 5,5 y 7,5. Además, para la mejora del periodo de almacenamiento o la estabilidad de las formulaciones acuosas, también puede resultar deseable incluir agentes adicionales, tales como glicerol. De esta manera, se consigue que las formulaciones de variantes de VEGF-E resulten apropiadas para la administración parenteral y, en particular, la administración intravenosa.

15 **[0223]** Las composiciones terapéuticas de los polipéptidos VEGF-E o agonistas o antagonistas se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla de la molécula deseada que presenta el grado de pureza apropiado, con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Oslo, A., editor, 1980), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilparabén o propilparabén; catecol; resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

30 **[0224]** Entre los ejemplos adicionales de dichos portadores se incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas glicéridas mixtas de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias de base celulosa y polietilenglicol. Entre los portadores para las formas tópicas o de base gel se incluyen polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa o metilcelulosa sódicas, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, convenientemente se utilizan formas de depósito convencionales. Entre dichas formas se incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, esparadrapos, formas de inhalación, pulverizaciones nasales, tabletas sublinguales y preparaciones de liberación sostenida. Los polipéptidos VEGF-E o agonistas o antagonistas típicamente se formulan en dichos vehículos a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 100 mg/ml.

**[0225]** Otra formulación comprende incorporar un polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo en productos formados. Estos productos pueden utilizarse para modular el crecimiento de las células endoteliales y la angiogénesis. Además, con estos productos puede modularse la invasión tumoral y la metástasis.

45 **[0226]** El VEGF-E que se utilizará para la administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo membranas de 0,2 micrómetros). El VEGF-E habitualmente se almacena en forma liofilizada o en forma de solución acuosa si es altamente estable frente a la desnaturalización térmica u oxidativa. El pH de las preparaciones de VEGF-E típicamente se encuentra comprendido entre aproximadamente 6 y 8, aunque también pueden resultar apropiados valores de pH más altos o más bajos en determinados casos. Se entenderá que la utilización de determinados excipientes, portadores o estabilizadores anteriormente indicados resultará en la formación de sales del VEGF-E.

55 **[0227]** Puede encontrarse presente un isotonicador para garantizar la isotonicidad de una composición líquida del polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo, e incluye alcoholes de azúcar polihídrico, preferentemente alcoholes trihídricos o de azúcar superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Estos alcoholes de azúcar pueden utilizarse solos o en combinación. Alternativamente, puede utilizarse cloruro sódico u otras sales inorgánicas apropiadas para hacer que las soluciones sean isotónicas.

**[0228]** El tampón puede ser, por ejemplo, un tampón acetato, citrato, succinato o fosfato, dependiendo del pH deseado. El pH de un tipo de formulación líquida de la presente invención se tampona en el intervalo de entre aproximadamente 4 y 8, con preferencia aproximadamente el pH fisiológico.

**[0229]** Los conservantes fenol, alcohol bencílico y haluros, por ejemplo cloruro, de bencetonio, son agentes antimicrobianos conocidos que pueden utilizarse.

**[0230]** Las composiciones terapéuticas del polipéptido VEGF-E generalmente se introducen en un recipiente que presenta una abertura de acceso estéril, por ejemplo una bolsa o vial de solución intravenosa con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica. Las formulaciones preferentemente se administran en forma de inyecciones intravenosas (i.v.), subcutáneas (s.c.) o intramusculares (i.m.) repetidas, o en forma de formulaciones de aerosol adecuadas para la administración intranasal o intrapulmonar (para la administración intrapulmonar ver, por ejemplo, la patente EP nº 257.956).

**[0231]** El polipéptido VEGF-E también puede administrarse en la forma de preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, matrices que se encuentran en la forma de productos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato), tal como describen Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981, y Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982, o alcohol polivinílico), poliláctidos (patentes US nº 3.773.919, patente EP nº 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers 22:547-556, 1983), copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer *et al.*, *supra*), ácido láctico-ácido glicólico no degradable, tal como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido) y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico (patente EP nº 133.988).

**[0232]** Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación intermolecular de enlaces S-S mediante el intercambio de tiosulfuros, la estabilización puede conseguirse mediante la modificación de los residuos sulfhidrilo, liofilizando las soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas. Entre las composiciones de polipéptido VEGF-E de liberación controlada también se incluye el polipéptido VEGF-E atrapado en liposomas. Los liposomas que contiene polipéptido VEGF-E se preparan mediante procedimientos conocidos *per se*: patente DE nº 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980; patentes EP nº 52.322, nº 36.676, nº 88.046, nº 143.949, nº 142.614; solicitud de patente japonesa nº 83-118008; patentes US nº 4.485.045 y nº 4.544.545; y patente US nº 102.324. Habitualmente los liposomas son de del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200 a 800 Angstroms), en el que el contenido de lípidos es superior a aproximadamente 30% molar de colesterol, ajustando la proporción seleccionada para la terapia óptima.

**[0233]** La dosis terapéuticamente eficaz de polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo evidentemente variará dependiendo de factores tales como la condición patológica que debe tratarse (incluyendo la prevención), el procedimiento de administración, el tipo de compuesto que se utiliza para el tratamiento, cualquier coterapia implicada, la edad del paciente, su peso, su condición médica general, el historial médico, etc., y su determinación se encuentra perfectamente comprendida dentro de los conocimientos de un médico en ejercicio. Por consiguiente, resultará necesario para el terapeuta titular la dosis y modificar la vía de administración según resulte necesario para obtener el efecto terapéutico máximo. Si el polipéptido VEGF-E presenta un rango de huéspedes estrecho, para el tratamiento de pacientes humanos, resultan preferentes formulaciones que comprenden polipéptido VEGF-E humano, más preferentemente polipéptido VEGF-E humano de secuencia nativa. El médico administrará polipéptido VEGF-E hasta alcanzar una dosis que alcance el efecto deseado para el tratamiento de la condición en cuestión. Por ejemplo, si el objetivo es el tratamiento de CHF, la cantidad sería la que inhiba la hipertrofia cardíaca progresiva asociada a esta condición. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ecocardiografía. De manera similar, en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, el polipéptido VEGF-E puede administrarse sobre una base empírica.

**[0234]** Con las directrices anteriormente indicadas, la dosis eficaz generalmente se encontrará comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1,0 mg/kg, más preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 1 mg/kg, todavía más preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 0,1 mg/kg.

**[0235]** Para la utilización no oral en el tratamiento de la hipertensión humana adulta, resulta ventajoso administrar polipéptido VEGF-E en la forma de una inyección de entre aproximadamente 0,01 y 50 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,05 y 20 mg, más preferentemente entre aproximadamente 1 y 20 mg por kg de peso corporal, 1 a 3 veces al día mediante inyección intravenosa. Para la administración oral, preferentemente se administra una molécula basada en el polipéptido VEGF-E a una dosis de entre aproximadamente 5 mg y 1 g, preferentemente de entre aproximadamente 10 y 100 mg, por kg de peso corporal, 1 a 3 veces al día. Debe apreciarse que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse a un nivel mínimo seguro, por ejemplo menos de 0,5 ng/mg de proteína. Además, para la administración en el ser humano, las formulaciones preferentemente son estériles,

pirógenas, seguras generalmente y puras según los requisitos de la FDA Office and Biologics standards.

**[0236]** El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene polipéptido VEGF-E que debe utilizarse en la regeneración de tejidos será determinado por el médico responsable considerando diversos factores que modifican la acción de los polipéptidos, por ejemplo la cantidad de peso de tejido que se desea que se forme, el sitio del daño, el estado del tejido dañado, el tamaño de la herida, el tipo de tejido dañado (por ejemplo hueso), la edad, sexo y dieta del paciente, la severidad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. La dosis puede variar con el tipo de matriz utilizado en la reconstitución y con inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como IGF-I, a la composición final también puede afectar a la dosis. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación periódica del crecimiento y/o reparación del tejido/hueso, por ejemplo rayos X, determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

**[0237]** La vía de administración del polipéptido VEGF-E o antagonista o agonista se establece de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo mediante inyección o infusión por vías intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraocular, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación, o mediante sistemas de liberación sostenida tal como se indica posteriormente. El polipéptido VEGF-E o antagonistas del mismo también se administran convenientemente mediante vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, ejerciendo efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. La vía intraperitoneal se prevé que resulte particularmente útil, por ejemplo en el tratamiento de los tumores ováricos.

**[0238]** Si se utiliza un péptido o molécula pequeña como antagonista o agonista, preferentemente se administra por vía oral o no oral en la forma de un líquido o de un sólido en mamíferos.

**[0239]** Entre los ejemplos de sales farmacológicamente aceptables de moléculas que forman sales y que resultan útiles posteriormente en la presente memoria se incluyen las sales de metal alcalino (por ejemplo sal sódica, sal potásica), sales de metal alcalino-térreo (por ejemplo sal cálcica, sal magnésica), sales amónicas, sales de base orgánica (por ejemplo sal de piridina, sal trietilamina), sales de ácido inorgánico (por ejemplo hidrocioruro, sulfato, nitrato) y sales de ácido orgánico (por ejemplo acetato, oxalato, p-toluenosulfonato).

**[0240]** Para las composiciones de la presente invención que resultan útiles para la regeneración de hueso, cartílago, tendón o ligamento, el procedimiento terapéutico incluye administrar la composición tópicamente, sistémicamente o localmente en forma de un implante o dispositivo. Durante la administración, la composición terapéutica para la utilización en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Además, la composición deseablemente puede encapsularse o inyectarse en una forma viscosa para la administración en el sitio de lesión del hueso, cartílago o tejido. La administración tópica puede resultar adecuada para la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Preferentemente, para la formación de hueso y/o cartílago, la composición incluye una matriz capaz de administrar la composición que contiene proteína en el sitio de la lesión de hueso y/o cartílago, proporcionando una estructura para el hueso y cartílago en desarrollo y preferentemente capaz de ser reabsorbida en el cuerpo. Este tipo de matrices puede formarse de materiales en la actualidad utilizados para otras aplicaciones médicas implantadas.

**[0241]** La elección de material de matriz se basa en la bicompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y químicamente definidas: sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y polianhídridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y se encuentran bien definidos biológicamente, por ejemplo hueso o colágeno dérmico. Las matrices adicionales comprenden proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y se encuentran químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar comprendidas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material anteriormente indicados, tales como el ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden alterarse en su composición, tal como en el calcio-aluminato-fosfato y procesarse para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

**[0242]** Una realización específica es un copolímero 50:50 (peso molar) de ácido láctico y ácido glicólico en la forma de partículas porosas que presentan diámetros comprendidos entre 150 y 800 micrómetros. En algunas aplicaciones resulta útil utilizar un agente secuestrador, tal como carboximetilcelulosa o coágulo sanguíneo autólogo, para evitar que las composiciones de polipéptido se disocien de la matriz.

**[0243]** Una familia adecuada de agentes secuestradores son los materiales celulósicos, tales como las alquilcelulosas (incluyendo las hidroxialquilcelulosas), incluyendo metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa, siendo preferentes las sales catiónicas de la carboximetilcelulosa (CMC). Entre otros agentes secuestradores preferentes se incluyen ácido hialurónico, alginato sódico, poli(etilenglicol), óxido de polioxietileno, polímero carboxivinilo y alcohol polivinílico. La cantidad de agente secuestrador útil en la presente invención es de entre 0,5% y 20% en peso, preferentemente 1 a 10% en peso basado en el peso total de la formulación, que representa la cantidad necesaria para evitar la desorción del polipéptido (o su antagonista) respecto a la matriz de polímero y para permitir la manipulación correcta de la

composición, aunque no en el grado que evita que las células progenitoras infiltren la matriz, proporcionando de esta manera al polipéptido (o a su antagonista) la oportunidad de ayudar a la actividad osteogénica de las células progenitoras.

5 **[0244]** Generalmente, en el caso de que el trastorno lo permita, debe formularse y dosificarse el VEGF-E para la administración específica de sitio. Ello resulta conveniente en el caso de heridas y úlceras.

10 **[0245]** En el caso de que se aplique tópicamente el VEGF-E se combina convenientemente con otros ingredientes, tales como portadores y/o adyuvantes. No existen limitaciones a la naturaleza de dichos otros ingredientes, excepto en que deben ser farmacéuticamente aceptables y eficaces para su administración pretendida, y no deben degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Entre los ejemplos de vehículos adecuados se incluyen pomadas, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Las composiciones también pueden impregnarse en parches transdérmicos, esparadrapos y vendas, preferentemente en forma líquida o semilíquida. Para obtener una formulación de gel, el VEGF-E formulado en una composición líquida puede mezclarse con una cantidad eficaz de un polisacárido soluble en agua o polímero sintético, tal como polietilenglicol, formando un gel de la viscosidad apropiada para la aplicación tópica. El polisacárido que puede utilizarse incluye, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como derivados eterificados de celulosa, incluyendo alquilcelulosas, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropil celulosa; almidón y almidón fraccionado; ágar; ácido alginico y alginatos; goma arábica; pululano; agarosa; carragenano; dextrinas; fructanos; inulina; mananos; xilanos; arabinanos; quitosanos; glucógenos; glucanos; y biopolímeros sintéticos, así como gomas, tales como la goma xantano, la goma guar, la goma de garrofín, la goma arábica, la goma tragacanto y la goma karaya, y derivados y mezclas de los mismos. El agente gelificante preferente de la presente invención es una que sea inerte para los sistemas biológicos, no tóxico, de preparación simple y no excesivamente fluido o viscoso, y no debe desestabilizar el VEGF-E que se mantiene en su interior.

15 **[0246]** Preferentemente, el polisacárido es un derivado eterificado de la celulosa, más preferentemente uno que se encuentre bien definido, purificado y listado en la USP, por ejemplo metilcelulosa y los derivados hidroxialquilcelulosa, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Más preferente en la presente invención es la metilcelulosa.

20 **[0247]** El polietilenglicol útil para la gelificación típicamente es una mezcla de polietilenglicoles de bajo y alto peso molecular para obtener la viscosidad apropiada. Por ejemplo, una mezcla de un polietilenglicol de peso molecular 400 a 6500 con uno de peso molecular 1.500 resultaría eficaz para este fin en el caso de encontrarse mezclado en la proporción correcta para obtener una pasta.

25 **[0248]** La expresión "soluble en agua" tal como se aplica a los polisacáridos y a los polietilenglicoles pretende incluir las soluciones coloidales y dispersiones. En general, la solubilidad de los derivados de la celulosa se encuentra determinada por el grado de sustitución de grupos éter, y los derivados estabilizantes útiles en la presente invención deben presentar una cantidad suficiente de dichos grupos éter por unidad de anhidroglucosa en la cadena de celulosa de manera que los derivados sean solubles en agua. Un grado de sustitución de éter de por lo menos 0,35 grupos éter por unidad de anhidroglucosa generalmente resulta suficiente. Además, los derivados de celulosa pueden encontrarse en la forma de sales de metal alcalino, por ejemplo las sales de Li, Na, K o Cs.

30 **[0249]** Si se utiliza metilcelulosa en el gel, preferentemente comprende aproximadamente 2% a 5%, más preferentemente aproximadamente 3% del gen, y el VEGF-E se encuentra presente en una cantidad de entre aproximadamente 300 y 1.000 mg por ml de gel.

### 13. Terapias de combinación

35 **[0250]** La eficacia del polipéptido VEGF-E o de un agonista o antagonista del mismo en la prevención o el tratamiento del trastorno en cuestión puede mejorarse administrando el agente activo en serie o en combinación con otro agente que resulte eficaz para dichos fines, en la misma composición o en composiciones separadas. Por lo tanto, se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención combinar la terapia de VEGF-E con otras terapias nuevas o convencionales (por ejemplo, factores de crecimiento, tales como VEGF, aFGF, bFGF, PDGF, IGF, NGF, esteroides anabólicos, EGF o TGF-alfa) para incrementar la actividad de cualquiera de los factores de crecimiento, incluyendo VEGF-E, en la estimulación de la proliferación, supervivencia, diferenciación y reparación celulares. No resulta necesario que dichos fármacos de cotratamiento se incluyan *per se* en las composiciones de la presente invención, aunque ello resultaría conveniente en el caso de dichos fármacos sean proteicos. Dichas mezclas se administran convenientemente de la misma manera y para los mismos fines que el VEGF-E utilizado solo.

40 **[0251]** Para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca, la terapia de polipéptido VEGF-E puede combinarse con la administración de inhibidores de factores conocidos de hipertrofia de miocitos cardíacos, por ejemplo inhibidores de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, tales como fenilefrina; inhibidores de la endotelina 1, tales como BOSENTAN™ y MOXONODIN™; inhibidores de CT-1 (patente US nº 5.679.545); inhibidores de LIF; inhibidores de la ACE; inhibidores de la des-aspartato-angiotensina I (patente US nº 5.773.415) e inhibidores de la angiotensina II.

45 **[0252]** Para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca asociada a la hipertensión, puede administrarse polipéptido

VEGF-E en combinación con agentes bloqueadores del receptor  $\beta$ -adrenérgico, por ejemplo propanolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol o carvedilol; inhibidores de la ACE, por ejemplo quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril o lisinopril; diuréticos, por ejemplo clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzotiazida, diclorfenamida, acetazolamida o indapamida; y/o bloqueantes de los canales de calcio, por ejemplo diltiazem, nifedipina, verapamil o nicardipina. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes terapéuticos identificados en la presente invención por sus VEGF-Es genéricos se encuentran disponibles comercialmente y deben administrarse siguiendo las instrucciones del fabricante respecto a la dosis, administración, efectos adversos, contraindicaciones, etc. (ver, por ejemplo, Physicians' Desk Reference (Medical Economics Data Production Co.; Montvale, N.J., 1995), 51a edición).

**[0253]** Son candidatos preferentes para la terapia de combinación en el tratamiento de la cardiomiopatía hipertrófica, los fármacos bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos (por ejemplo propanolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol o carvedilol), verapamil, diltiazem, nifedipina o diltiazem. El tratamiento de la hipertrofia asociada a presión sanguínea elevada puede requerir la utilización de terapia farmacológica antihipertensiva utilizando bloqueantes del canal del calcio, por ejemplo diltiazem, nifedipina, verapamil o nicardipina; agentes bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos; diuréticos, por ejemplo clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzotiazida, diclorfenamida, acetazolamida o indapamida; y/o inhibidores de la ACE, por ejemplo quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril o lisinopril.

**[0254]** Para otras indicaciones, los polipéptidos VEGF-E o los antagonistas de los mismos pueden combinarse con otros agentes beneficiosos para el tratamiento del defecto del hueso y/o cartílago, herida o tejido en cuestión. Entre estos agentes se incluyen diversos factores de crecimiento, tales como EGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , IGF, FGF y CTGF.

**[0255]** De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos antagonistas anti-VEGF-E utilizados para tratar el cáncer pueden combinarse con agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o inhibidores del crecimiento, tal como se ha identificado anteriormente. Además, para el tratamiento del cáncer, el anticuerpo antagonista anti-VEGF-E se administra convenientemente en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, implicando la irradiación o la administración de sustancias radioactivas.

**[0256]** Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos administrados en combinación con polipéptido VEGF-E o antagonista del mismo se dejan a discreción del médico o del veterinario. La administración y ajuste de las dosis se realiza a fin de conseguir el máximo control de las condiciones bajo tratamiento. Por ejemplo, para tratar la hipertensión, estas cantidades idealmente tienen en cuenta la utilización de diuréticos o de digitalis, y condiciones tales como la hipertensión o la hipotensión, la insuficiencia renal, etc. La dosis además dependerá de factores tales como el tipo de agente terapéutico que debe utilizarse y del paciente específico bajo tratamiento. Típicamente la cantidad utilizada será la misma dosis que la utilizada si el agente terapéutico dado se administra sin polipéptido VEGF-E. Una proporción molar útil de VEGF-E a factores de crecimiento secundarios típicamente es 1:0,1 a 10, resultando preferentes las cantidades aproximadamente equimolares.

#### 14. Productos manufacturados

**[0257]** Un producto manufacturado, tal como un kit que contiene polipéptido VEGF-E o antagonistas del mismo útil para el diagnóstico o el tratamiento de los trastornos indicados anteriormente, comprenden por lo menos un recipiente y un marcaje. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y probetas de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta eficaz para diagnosticar o tratar la condición y puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presente un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el polipéptido VEGF-E o un agonista o antagonista del mismo. La etiqueta sobre el recipiente o asociada al mismo indica que la composición se utiliza para diagnosticar o tratar la condición de elección. El producto manufacturado puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e impresos en el paquete con instrucciones de utilización. El producto manufacturado también puede comprender un segundo o tercer recipiente con otro agente activo tal como se ha indicado anteriormente.

#### F. Anticuerpos anti-VEGF-E

**[0258]** La presente invención utiliza anticuerpos anti-polipéptido VEGF-E. Entre los anticuerpos ejemplares se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

##### 1. Anticuerpos policlonales

**[0259]** Los anticuerpos anti-VEGF-E de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos del experto en la materia. Pueden cultivarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectan en el

mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido VEGF-E o una proteína de fusión del mismo. Puede resultar útil para conjugar el agente inmunizante con una proteína que es conocido que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la hemocianina de lapa americana, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina, el inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que pueden utilizarse se incluyen el adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin necesidad de experimentación excesiva.

## 2. Anticuerpos monoclonales

10 **[0260]** Los anticuerpos anti-VEGF-E pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales puede prepararse utilizando procedimientos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975. En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado típicamente se inmuniza con un agente inmunizante para inducir que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los  
15 linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

**[0261]** El agente inmunizante típicamente incluye el polipéptido VEGF-E o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos sanguíneos periféricos ("PBLs") si se desean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, páginas 59 a 103). Las líneas celulares inmortalizadas habitualmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), evitando estas sustancias el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

20 **[0262]** Las líneas celulares inmortalizadas preferentes son aquéllas que se fusionan eficientemente, dan soporte a un elevado nivel de expresión estable de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Son líneas celulares inmortalizadas más preferentes las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker Inc., New York, 1987, páginas 51 a 63).

30 **[0263]** El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma seguidamente puede someterse a ensayo para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un polipéptido VEGF-E. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos de la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem. 107:220, 1980.

45 **[0264]** Tras identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos estándares (Goding, *supra*). Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* en forma de ascites en un mamífero.

50 **[0265]** Los anticuerpos secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o de líquido ascites mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

55 **[0266]** Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la patente US nº 4.816.567. El ADN codificante de los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferente de dicho AND. Tras el aislamiento, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en las células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, con el fin de

obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo mediante la sustitución de las secuencias codificantes de los dominios constantes de cadena ligera y pesada humanas en el sitio de las secuencias murinas homólogas (patente US nº 4.816.567) o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de la totalidad o de parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. Este polipéptido no inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

**[0267]** Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc, de manera que se evita el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo aminoácido o se delecionan de manera que se evita el entrecruzamiento.

**[0268]** Los procedimientos *in vitro* también resultan adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse utilizando técnicas rutinarias conocidas de la técnica.

### 3. Anticuerpos humanizados

**[0269]** Los anticuerpos anti-VEGF-E de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias ligantes de antígeno de los anticuerpos) que contienen un mínimo de secuencias derivadas de la inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo que presente la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR ni secuencias de marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos un dominio variable, y típicamente dos, en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones CDR corresponden a aquéllas de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son aquéllas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992).

**[0270]** Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos de la técnica. Generalmente un anticuerpo humanizado presenta uno o más residuos aminoácidos introducidos en el mismo procedentes de una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "de importación", que típicamente se obtienen de un dominio variable "de importación". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988) mediante la sustitución de CDRs de roedor o secuencias de CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

**[0271]** También pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas de la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381, 1991; Maks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581, 1991). Las técnicas de Cole *et al.* y de Boerner *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy; Alan R. Liss, página 77, 1985; y Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1):86-95, 1991).

### 4. Anticuerpos biespecíficos

**[0272]** Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que presentan especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un polipéptido VEGF-E, siendo la otra para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína o receptor o subunidad de receptor de superficie celular.

**[0273]** Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena

pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas presentan diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305:537-539, 1983). Debido a la selección aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de entre las que únicamente una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta habitualmente se consigue mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en la patente WO nº 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J. 10:3655-3659, 1991.

[0274] Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, comprendiendo por lo menos parte de las regiones CH2 y CH3 de bisagra. Resulta preferente disponer de una primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN codificantes de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121:210, 1986.

#### 5. Anticuerpos heteroconjugados

[0275] Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Esto anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunológico a células no deseadas (patente US nº 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (patente WO nº 91/00360; patente WO nº 92/200373; patente EP nº 03089). Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos de la química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuros o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este fin se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos dados a conocer, por ejemplo, en la patente US nº 4.676.980.

#### 6. Manipulación de la función efectora

[0276] Puede resultar deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de manera que se incremente, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, puede introducirse uno o más residuos cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede presentar una capacidad de internalización mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementadas (ver Caron *et al.*, J. Exp. Med. 176:1191-1195, 1992; y Shopes, J. Immunol. 48:2918-2922, 1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral incrementada también pueden prepararse utilizando entrecruzadores heterobifuncionales, tal como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research 53:2560-2565, 1993. Alternativamente, puede manipularse un anticuerpo que presenta regiones Fc duales y puede presentar de esta manera capacidades de lisis del complemento y de ADCC incrementadas (ver Stevenson *et al.*, AntiCancer Drug Design 3:219-230, 1989).

#### 7. Inmunoconjugados

[0277] Asimismo, la invención se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados han sido descritos anteriormente en la presente memoria. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A diftérica, fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se encuentra disponible una diversidad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re.

[0278] Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se preparan utilizando una diversidad de agentes acoplantes de proteína bifuncional, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis(p-diazo-niumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluén-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-nitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina tal como describen Vitetta *et al.*, Science

238:1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo (ver la patente WO n° 94/11026).

5 **[0279]** En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un “receptor” (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento tumoral, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra en el paciente, seguido de la eliminación de la circulación de conjugado no unido utilizando un agente eliminador y después administración de un “ligando” (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

#### 8. Inmunoliposomas

10 **[0280]** Los anticuerpos dados a conocer en la presente invención también pueden formularse en forma de inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos de la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030, 1980; y las patentes US n° 4.485.045 y n° 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se dan a conocer en la patente US n° 5.013.556.

15 **[0281]** Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase reversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extrusionan a través de filtros de tamaño de poro definido, rindiendo liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas tal como describen Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257:286-288, 1982, mediante una  
20 reacción de intercambio de disulfuros. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) se encuentra opcionalmente contenido dentro de los liposomas (ver Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81(19):1484, 1989).

#### G. Usos de los anticuerpos anti-VEGF-E

**[0282]** Los anticuerpos anti-VEGF-E de la presente invención presentan diversas utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF-E pueden utilizarse en ensayos diagnósticos para los polipéptidos VEGF-E, por ejemplo  
25 detectando la expresión en células específicas, tejidos o suero. Pueden utilizarse diversas técnicas de ensayo diagnóstico conocidas de la técnica, tales como los ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo en fases heterogéneas u homogéneas (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., 1987, páginas 147 a 158). Los anticuerpos utilizados en los ensayos diagnósticos pueden marcarse con un grupo detectable. El grupo detectable debe ser  
30 capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S o <sup>125</sup>I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina, o un enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido de la técnica para conjugar el anticuerpo con el grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, Nature 144:945, 1962; David *et al.*,  
35 Biochemistry 13:1014, 1974; Pain *et al.*, J. Immunol. Meth. 40:219, 1981; y Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407, 1982.

**[0283]** Los anticuerpos anti-VEGF-E también resultan útiles para la purificación por afinidad de los polipéptidos VEGF-E a partir del cultivo celular recombinante o de fuentes naturales. En este procedimiento, los anticuerpos  
40 contra un polipéptido VEGF-E se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como resina Sephadex TM o papel de filtro utilizando procedimientos bien conocidos de la técnica. El anticuerpo inmovilizado seguidamente se pone en contacto con una muestra que contiene el polipéptido VEGF-E que debe purificarse, y después el soporte se lava con un solvente adecuado que separará sustancialmente la totalidad de la muestra excepto el polipéptido VEGF-E, que se encuentra unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado que liberará el polipéptido VEGF-E del anticuerpo.

#### 45 1. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

**[0284]** Pueden administrarse anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido VEGF-E identificado en la presente invención, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado dados a conocer  
anteriormente en la presente memoria, para el tratamiento de diversos trastornos tal como se ha indicado anteriormente y se indica posteriormente, en la forma de composiciones farmacéuticas.

50 **[0285]** En el caso de que el polipéptido VEGF-E sea intracelular y se utilicen anticuerpos completos como inhibidores, resultan preferentes los anticuerpos internalizantes. Sin embargo, también pueden utilizarse lipofecciones o liposomas para introducir el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. En el caso de que se utilicen fragmentos de anticuerpos, resulta preferente el fragmento inhibidor más pequeño que se una específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de las  
55 regiones variables de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas de péptidos que conservan la capacidad de ligar la secuencia de la proteína diana. Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893, 1993). La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según resulte

necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que incremente su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el fin pretendido.

**[0286]** Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármaco (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsula) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en *Pharmaceutical Sciences*, *supra*, de Remington.

**[0287]** Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Ello se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

**[0288]** Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que se encuentran en la forma de productos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietilmetacrilato) o alcohol polivinílico, poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, copolímero no degradable de etileno-acetato de vinilo, copolímero degradable de ácido láctico-ácido glicólico, tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico liberan moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y posiblemente en cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación intermolecular de enlaces S-S mediante intercambio de tio-disulfuros, la estabilización puede conseguirse mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones específicas de matriz de polímero.

## 2. Procedimientos de tratamiento que utilizan el anticuerpo

**[0289]** Se contempla que los anticuerpos contra el polipéptido VEGF-E se utilicen para tratar diversas condiciones cardiovasculares, endoteliales y angiogénicas tal como se ha indicado anteriormente.

**[0290]** Los anticuerpos se administran en un mamífero, preferentemente un ser humano, de acuerdo a procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. La administración intravenosa del anticuerpo resulta preferente.

**[0291]** Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración de los anticuerpos de la invención tal como se ha indicado anteriormente. Cuando los anticuerpos son para tratar el cáncer de acuerdo con la presente invención, el paciente que debe tratarse con dichos anticuerpos también pueden recibir radioterapia. Alternativamente, o adicionalmente, puede administrarse un agente quimioterapéutico al paciente. La preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos puede realizarse siguiendo las instrucciones del fabricante o tal como determine empíricamente el médico experto. La preparación y programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en: *Chemotherapy Service*, editor M.C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del anticuerpo, o puede administrarse simultáneamente con el mismo. El anticuerpo puede combinarse con un compuesto antiestrógeno, tal como tamoxifeno o EVISTA™, o un antiprogesterona, tal como onapristona (véase la patente EP nº 616812) en dosis conocidas para dichas moléculas.

**[0292]** En el caso de que los anticuerpos se utilicen para tratar el cáncer, puede resultar deseable administrar anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumor, tales como anticuerpos que se unen a uno o más de entre los receptores ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o VEGF. Entre ellos también se incluyen agentes indicados anteriormente. Además, el anticuerpo se administra convenientemente en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, implicando irradiación o la administración de sustancias radioactivas. Alternativamente, o adicionalmente, pueden coadministrarse en el paciente dos o más anticuerpos ligantes de dos o más antígenos iguales o diferentes dados a conocer en la presente invención. Ocasionalmente, también puede resultar beneficioso administrar una o más citoquinas en el paciente. En una realización preferente, los anticuerpos de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse en primer lugar, seguido de un anticuerpo de la presente invención. Sin embargo, la administración simultánea o la administración del anticuerpo de la presente invención en primer lugar también se encuentran contempladas. Las

dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquéllas utilizadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo de la presente invención.

**[0293]** En una realización, la vascularización de los tumores se ataca en terapia de combinación. El anticuerpo anti-polipéptido VEGF-E y otro anticuerpo (por ejemplo anti-VEGF) se administran a pacientes con tumor a dosis terapéuticamente eficaces según se determina, por ejemplo, mediante la observación de la necrosis del tumor o de sus focos metastásicos, en caso de existir alguno. Esta terapia se continúa hasta que ya no se observa ningún efecto beneficioso adicional con un agente auxiliar, tal como interferón alfa, beta o gamma, anticuerpo anti-HER2, heregulina, anticuerpo anti-hereregulina, factor D, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o agentes que estimulan la coagulación microvascular en tumores, tales como el anticuerpo anti-proteína C, el anticuerpo anti-proteína S o la proteína ligante de C4b (ver la patente WO n° 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o calor o radiación.

**[0294]** Debido a que la eficacia de los agentes auxiliares es variable, resulta deseable comparar su impacto sobre el tumor mediante cribado con matrices de manera convencional. La administración de anticuerpo anti-polipéptido VEGF-E y TNF se repite hasta conseguir el efecto clínico deseado. Alternativamente, se administra anticuerpo anti-polipéptido VEGF-E conjuntamente con TNF y, opcionalmente, uno o más agentes auxiliares. En los casos en los que se observan tumores sólidos en las extremidades o en otras localizaciones susceptibles de aislamiento de la circulación general, se administran en el tumor u órgano aislado los agentes terapéuticos indicados en la presente invención. En otras realizaciones, se administra en el paciente un antagonista FGF o PDGF, tal como un anticuerpo neutralizador anti-FGF o anti-PDGF, conjuntamente con el anticuerpo anti-polipéptido VEGF-E. El tratamiento con anticuerpos anti-polipéptido VEGF-E preferentemente puede suspenderse durante periodos de cicatrización de heridas o de neovascularización deseable.

**[0295]** Para la prevención o el tratamiento de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos, la dosis de anticuerpo apropiada dependerá del tipo de trastorno que debe tratarse, tal como se ha definido anteriormente, de la severidad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

**[0296]** Por ejemplo, dependiendo del tipo y severidad del trastorno, una dosis candidata inicial para la administración en el paciente es aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo 0,1 a 20 mg/kg) de anticuerpo, por ejemplo en una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria o semanal típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg, o m dependiendo de los factores indicados anteriormente. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite o se prolonga hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas del trastorno. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, incluyendo, por ejemplo, la obtención de imágenes radiográficas del tumor.

### 3. Productos manufacturados con anticuerpos

**[0297]** También se proporciona un producto manufacturado que contiene un recipiente con el anticuerpo y una etiqueta. Dichos productos se han descrito anteriormente, en los que el agente activo es un anticuerpo anti-VEGF-E.

### 4. Diagnóstico y pronóstico de tumores utilizando anticuerpos

**[0298]** Si la indicación para la que se utilizan los anticuerpos es el cáncer, aunque las proteínas de superficie celular, tales como receptores de crecimiento sobreexpresados en determinados tumores, son excelentes dianas para los fármacos candidatos o para el tratamiento de tumor (por ejemplo de cáncer), las mismas proteínas conjuntamente con los polipéptidos VEGF-E encuentran un uso adicional en el diagnóstico y el pronóstico de tumores. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos VEGF-E pueden utilizarse como diagnósticos o pronósticos de tumores.

**[0299]** Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, cualitativamente o cuantitativamente para detectar la expresión de genes, incluyendo el gen codificante del polipéptido VEGF-E. El anticuerpo preferentemente se dota de un marcaje detectable, por ejemplo fluorescente, y se monitoriza la unión mediante microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas de la técnica. Dichos ensayos de unión se llevan a cabo esencialmente tal como se ha descrito anteriormente.

**[0300]** La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos de gen marcador puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para este fin, se extrae un espécimen histológico del paciente y se aplica al mismo un anticuerpo marcado, preferentemente recubriendo una muestra biológica con el anticuerpo. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto de gen marcador en el tejido examinado. Resultará evidente para los expertos en la materia que se encuentran fácilmente disponibles para la detección *in situ* una amplia diversidad de procedimientos histológicos.

**[0301]** Los ejemplos siguientes se ofrecen únicamente a título ilustrativo, y no pretenden limitar el alcance de la

presente invención en modo alguno.

**[0302]** Se utilizaron reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos, siguiendo las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los ejemplos siguientes, y en la totalidad de la especificación, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

EJEMPLO 1: identificación de clones codificantes de una proteína de tipo VEGF (VEGF-E)

**[0303]** Se utilizaron sondas basadas en la etiqueta de secuencia expresada (EST) identificada de la base de datos de Incyte Pharmaceuticals debido a la homología con VEGF, para cribar una biblioteca de ADNc derivada de la línea celular de glioma humano G61. En particular, se utilizó "INC1302516" de Incyte Clone para generar las cuatro sondas siguientes:

(SEC ID nº 3) 5'-ACTTCTCAGTGCCATAAGGG;

(SEC ID nº 4) 5'-GAACTAAAGAGAACCGATACCATTTTCTGGCCAGGTTGTC;

(SEC ID nº 5) 5'-CACACAGCGTTTAACCAGG; y

(SEC ID nº 6) 5'-ACAACAGGCACAGTTCCCAC.

**[0304]** Se identificaron y se caracterizaron nueve posiciones. Tres clones contenían la región codificante completa y eran de secuencia idéntica. También se identificaron clones parciales a partir de una biblioteca pulmonar fetal y eran idénticos a la secuencia derivada de glioma con la excepción de un cambio de nucleótido, que no alteró el aminoácido codificado.

EJEMPLO 2: constructos de expresión

**[0305]** Para la expresión de proteínas de mamífero, se clonó el marco de lectura abierta (ORF) completo en un vector de expresión basado en CMV. Se insertaron una etiqueta epítipo (FLAG™, Kodak) y una etiqueta de histidinas (His8) entre el ORF y el codón de parada. Se transfectaron VEGF-E-His8 y VEGF-E-FLAG en células 293 renales embrionarias humanas mediante SuperFect™ (Qiagen) y se marcaron con un pulso durante 3 horas con (35S)-metionina y (35C)-cisteína. Ambas proteínas etiquetadas con epítipo comigran al someter a electroforesis en un gel de poli(acrilamida) (Novex) en tampón para muestra de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) 20 microlitros de medio condicionado libre de suero concentrado 15 veces. El plásmido de expresión VEGF-E-IgG se construyó mediante clonación del ORF frente a la secuencia de Fc humana (IgG).

**[0306]** El plásmido VEGF-E-IgG se cotransfectó con ADN Baculogold Baculovirus™ (Pharming) utilizando Lipofectin™ (GibcoBRL) en 10<sup>5</sup> células Sf9 cultivadas en medio TNM-FH Hink's™ (JRH Biosciences) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células se incubaron durante 5 días a 28°C. Se recolectó el sobrenadante y posteriormente se utilizó para la primera amplificación vírica mediante infección de las células Sf9 a una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 10. Las células se incubaron durante 3 días, después se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la expresión del plásmido recombinante mediante unión de 1 ml de sobrenadante a 30 µl de perlas CL-4B de proteína A-Sepharose™ (Pharmacia), seguido del posterior análisis SDS-PAGE. Se utilizó el sobrenadante de la primera amplificación para infectar un cultivo bajo centrifugación de 500 ml de células Sf9 cultivadas en medio ESF-921 (Expression Systems LLC) a una MOI aproximada de 0,1. Las células se trataron tal como anteriormente, excepto en que el sobrenadante recolectado se filtró a esterilidad. Se purificó proteína específica mediante unión a una columna de proteína A-sefarosa 4 Fast Flow™ (Pharmacia).

EJEMPLO 3: análisis de transferencia northern

**[0307]** Se obtuvieron de Clontech (Palo Alto, CA) transferencias de poli(A)+ARN humanos a partir de múltiples tejidos adultos y fetales y de líneas celulares tumorales. Se llevó a cabo la hibridación utilizando sondas marcadas con <sup>32</sup>P que contenían la región codificante completa y se lavaron en 0,1 x SSC, SDS al 0,1% a 63°C.

**[0308]** El ARNm de VEGF-E era detectable en pulmón, riñón, cerebro e hígado fetales y en corazón, placenta, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas adultos. También se encontró ARNm de VEGF-E en adenocarcinoma pulmonar A549 y en líneas celulares de adenocarcinoma cervical HeLa.

EJEMPLO 4: hibridación *in situ*

**[0309]** La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones de células o tejidos. Puede resultar útil, por ejemplo, identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución en tejidos de la transcripción, identificar y localizar la infección vírica, seguir los cambios de la síntesis de ARNm específica, y ayudar en el mapado de cromosomas.

**[0310]** La hibridación *in situ* se llevó a cabo según una versión optimizada del protocolo de Lu y Gillett, Cell Vision 1:169-176, 1994, utilizando ribosondas marcadas con <sup>33</sup>P generadas por PCR. Brevemente, se cortaron secciones

de tejidos humanos fijados en formalina e incluidos en parafina, se desparafinaron, se desproteizaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C y se procesaron adicionalmente para la hibridación *in situ* tal como describen Lu y Gillett, *supra*. Se generó una ribosonda antisentido marcada con (<sup>33</sup>P)UTP a partir de un producto PCR de 980 pb (utilizando los cebadores oligonucleótidos indicados posteriormente) y se hibridaron a 55°C durante la noche. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de traza nuclear KODAK NTB2<sup>TM</sup> y se expusieron durante 4 semanas.

#### Síntesis de ribosonda-<sup>33</sup>P

**[0311]** Se secaron en una centrífuga speed-vacuum. A cada tubo que contenía <sup>33</sup>P-UTP seco, se añadieron los ingredientes siguientes:

- 10            2,0 µl de tampón de transcripción 5x  
                  1,0 µl de DTT (100 mM)  
                  2,0 µl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 µl de cada uno de GTP, CTP y ATP 10 mM + 10 µl de H<sub>2</sub>O)  
                  1,0 µl de UTP (50 µM)  
                  1,0 µl de ARNsins
- 15            1,0 µl de molde de ADN (1 µg)  
                  1,0 µl de H<sub>2</sub>O  
                  1,0 µl de ARN polimerasa (para productos de PCR, T3=AS, T7=S, habitualmente)

20            **[0312]** Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadió un total de 1,0µl de ADNasa RQ1, seguido de la incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadió un total de 90µl de TE (Tris 10 m M, pH 7,6/EDTA 1 mM, pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La solución restante se cargó en una unidad de ultrafiltración MICROCON-50<sup>TM</sup>, y se centrifugó utilizando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un segundo tubo y se centrifugó utilizando el programa 2 (3 minutos). Tras la centrifugación de recuperación final, se añadió un total de 100 µl de TE. Después, se pipeteó 1µl del producto final sobre papel DE81 y se coóten 6 ml de BIOFLUOR II<sup>TM</sup>.

25            **[0313]** La sonda se corrió en un gel de TBE/urea. Se añadió un total de 1 a 3 µl de la sonda o 5 µl de ARN Mrk III a 3 µl de tampón de carga. Tras el calentamiento en un bloque de calor a 95°C durante tres minutos, el gel se situó inmediatamente sobre hielo. Los pocillos de gel se enjuagaron, y la muestra se cargó y se corrió a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en envoltorio de plástico (marca SARAN<sup>TM</sup>) y se expuso a película XAR con una pantalla intensificadora en un congelador de -70°C durante un periodo de entre una hora y toda la noche.

#### 30            Hibridación <sup>33</sup>P

##### A. Pretratamiento de secciones congeladas

35            **[0314]** Los portaobjetos se extrajeron del congelador, se situaron sobre bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se introdujeron en un incubador de 55°C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre hielo en la campana de humos y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos, a temperatura ambiente (25 ml de 20 x SSC + 975 ml s.c. de H<sub>2</sub>O). Tras la desproteización en 0,5µg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de solución madre de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa libre de ARNasa precalentada), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, al 95% y al 100%, 2 minutos cada vez.

##### 40            B. Pretratamiento de secciones incluidas en parafina

45            **[0315]** Los portaobjetos se desparafinaron, se situaron en H<sub>2</sub>O s.c. y se enjuagaron dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteizaron en 20 µg/ml de proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa libre de ARNasa; 37°C, 15 minutos) para el tejido embrionario humano, o 8 x proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón de ARNasa, 37°C, 30 minutos) para los tejidos en formalina. El enjuague posterior en 0,5 x SSC y la deshidratación se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

##### C. Prehibridación

50            **[0316]** Los portaobjetos se dispusieron en una caja de plástico revestida de tampón Box (4 x SSC, formamida al 50%). El papel de filtro se encontraba saturado. El tejido se cubrió con 50 de tampón de hibridación (3,75 g de dextrán sulfato + 6 ml de H<sub>2</sub>O s.c.), se agitó con vórtex y se calentó en un microondas durante 2 minutos con el

tapón aflojado. Tras enfriar sobre hielo, se añadieron 18,75 ml de formamida, 3,75 ml de 20 x SSC y 9 ml s.c. de H<sub>2</sub>O, y el tejido se agitó bien con vórtex y se incubó a 42°C durante 1 a 4 horas.

D. Hibridación

5 **[0317]** Se calentaron a 95°C durante 3 minutos sonda de 1,0 x 10<sup>6</sup> cpm y 1 μl de ARNt (solución madre de 50 mg/ml). Los portaobjetos se enfriaron sobre hielo y se añadieron 40 μl de tampón de hibridación por portaobjetos. Tras agitar con vórtex, se añadieron 50 μl de mezcla de <sup>33</sup>P a 50 μl de solución de prehibridación sobre el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 55°C.

E. Lavados

10 **[0318]** El lavado se realizó durante 2x10 minutos con 2xSSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V<sub>f</sub>=4L), seguido del tratamiento con ARNasa a 37°C durante 30 minutos (500 μl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa = 20 μg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2x10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de lavado astringente fueron las siguientes: 2 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V<sub>f</sub>=4L).

F. Cebadores oligonucleótidos

15 **[0319]** Se llevó a cabo análisis *in situ* en la secuencia DNA29101 dada a conocer en la presente invención. Los cebadores oligonucleótidos utilizados para preparar la ribosonda para estos análisis fueron los siguientes:

p1: 5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGC GGA ATC CAA CCT GAG TAG (SEC ID n° 7)

p2: 5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCG GCT ATC CTC CTG TGC TC (SEC ID n° 8)

G. Resultados

20 **[0320]** Los resultados de dicho análisis *in situ* fueron los siguientes.

25 **[0321]** Para las extremidades inferiores fetales humanas, se produjo expresión de VEGF-E en los huesos de las extremidades inferiores en desarrollo en el borde del anlage cartilaginoso (es decir, circundando el borde exterior), en tendones en desarrollo, en músculo liso vascular y en células que abrazan miocitos y miotubos de músculo esquelético en desarrollo. También se observó expresión en la placa de crecimiento epifisial. Se produjo expresión de VEGF-E en el nódulo linfático fetal humano en el seno marginal de los nódulos linfáticos en desarrollo. Se producía expresión en el timo fetal humano en la región subcapsular del córtex tímico, posiblemente representando las células epiteliales subcapsulares o los timocitos doble negativos en proliferación que se encuentran en esta región. El bazo fetal humano era negativo para la expresión.

30 **[0322]** Se observó expresión traqueal de VEGF-E en músculo liso de tejido fetal humano. Se producía expresión focal de VEGF-E en el cerebro fetal humano (córtex cerebral), en neuronas corticales. La médula espinal fetal humana era negativa. Se producía expresión de VEGF-E en intestino delgado fetal humano en músculo liso. Además, se producía expresión generalizada de VEGF-E en tiroides fetal humano sobre el epitelio del tiroides. La glándula adrenal fetal humana era negativa. Se observó expresión hepática de VEGF-E en células de la placa ductal fetal humana, así como expresión en el estómago fetal humano en músculo liso mural y expresión en piel fetal humana en la capa basal del epitelio escamoso. Además, se producía expresión en placenta fetal humana de VEGF-E en células intersticiales en microvilli trofoblásticos, y expresión en cordón fetal humano en la pared de las arterias y venas.

40 **[0323]** Al realizar ensayos en ovarios de ratas superovuladas, la totalidad de las secciones, en ovarios de control y superovulados, estos resultaron negativos con sondas tanto antisentido como sentido. El mensaje no se expresaba en este modelo o la sonda humana no reaccionaba cruzadamente con la rata.

**[0324]** Se observó expresión elevada de VEGF-E en los sitios adicionales siguientes:

ovario de chimpancé: células granulosas de folículos en maduración, se observó una señal de intensidad más baja sobre las células tecales.

paratiroides de chimpancé: expresión elevada sobre las células principales.

45 testículos fetales humanos: expresión moderada sobre células estromales circundantes de los túbulos en desarrollo.

pulmón fetal humano: expresión elevada sobre condrocitos en el árbol bronquial en desarrollo, y expresión reducida sobre el epitelio bronquial en ramificación.

**[0325]** No se observó expresión específica en los carcinomas de célula renales, gástricos y colónicos.

50 **[0326]** Entre los tejidos fetales examinados en el estudio anterior (semanas E12-E16) se incluyeron:

placenta, cordón umbilical, hígado, riñón, adrenales, tiroides, pulmones, corazón, grandes vasos, esófago, estómago, intestino delgado, bazo, timo, páncreas, cerebro, ojo, médula espinal, pared corporal, pelvis y extremidad inferior.

**[0327]** Entre los tejidos adultos examinados en el estudio anteriormente indicado se incluyeron:

- 5 hígado, riñón, adrenal, miocardio, aorta, bazo, nódulo linfático, páncreas, pulmón, piel, córtex cerebral (rm), hipocampo (rm), cerebelo (rm), pene, ojo, vejiga, estómago, carcinoma gástrico, colon, carcinoma colónico y condrosarcoma, así como tejidos que presentan daño hepático inducido por acetaminofeno, y cirrosis hepática.

10 **[0328]** En resumen, el patrón de expresión sugiere que VEGF-E podría estar implicado en la diferenciación y/o proliferación celular. Los patrones de expresión en el músculo esquelético en desarrollo sugieren que la proteína podría estar implicada en la diferenciación y/o proliferación de mioblastos.

EJEMPLO 5: ensayo de hipertrofia de miocitos

15 **[0329]** Se sembraron en placa por duplicado a una densidad de 75.000 células/ml en una placa de 96 pocillos, miocitos procedentes de ventrículo cardiaco de rata Sprague Dawley Harlan neonatal (23 días de gestación). Las células se trataron durante 48 horas con 2.000, 200, 20 ó 2 ng/ml de VEGF-E-IgG. Se tiñeron los miocitos con cristal violeta para visualizar la morfología y se puntuaron en una escala de 3 a 7, siendo 3 no estimulados y 7, hipertrofia completa.

**[0330]** 2.000 ng/l y 200 ng/l de VEGF-E causaron hipertrofia, puntuados como 5.

EJEMPLO 6: ensayo de proliferación celular

20 **[0331]** Se cultivaron células C3HIOT1/2 de fibroblastos embrionario de ratón en 50:50 medio F12 de Ham:DMEM bajo en glucosa que contenía suero de feto bovino (FCS) al 10%. Las células se sembraron en placa por duplicado en una placa de 24 pocillos a densidades de 1.000, 2.000 y 4.000 células/pocillo. Tras 48 horas, las células se pasaron a medio que contenía FCS al 2% y se incubaron durante 72 horas con 200, 800 ó 2.000 ng/ml de VEGF-E o sin adición de factor de crecimiento.

25 **[0332]** Se midió aproximadamente 1,5 veces más células en presencia de 200 ng/ml de VEGF-E que en ausencia del mismo, a las tres densidades celulares.

EJEMPLO 7: ensayo de supervivencia de células endoteliales

30 **[0333]** Se mantuvieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, Cell Systems) en medio completo (Cell Systems) y se sembraron en placa por triplicado en medio libre de suero (Basic Media de Cell Systems que contenía BSA al 0,1%) a una densidad de 20.000 células/pocillo de una placa de 48 pocillos. Las células se incubaron durante 5 días con 200 ó 400 ng/ml de VEGF-E-IgG, 100 ng/ml de VEGF, 20 ng/ml de FGF básico o sin adición.

**[0334]** La supervivencia fue 2 a 3 veces superior con VEGF-E en comparación con la falta de adición de factor de crecimiento. Se incluyeron VEGF y FGF básico como controles positivos.

35 EJEMPLO 8: estimulación de la formación de tubo endotelial

**[0335]** El presente ensayo sigue el ensayo descrito en Davis y Camarillo, Experimental Cell Research 224:39-51, 1996, o uno modificado respecto al mismo de la manera siguiente:

40 Protocolo: se mezclaron células HUVEC (número de pases inferior a 8 desde el primario) con colágeno de tipo I de cola de rata, concentración final de 2,6 mg/ml a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/ml y se sembraron en placa a 50  $\mu$ l por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se dejó que el gel se solidificase durante 1 hora a 37°C.

45 después, se añadieron 50 $\mu$ l por pocillo de medio de cultivo M199 suplementado con FBS al 1% y una muestra de VEGF-E (a diluciones de 1%, 0,1% y 0,01%, respectivamente) conjuntamente con pigmento 6-FAM-FITC 1  $\mu$ M para teñir vacuolas durante la formación de las mismas. Las células se incubaron a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, se fijaron con 3,7% de formalina a temperatura ambiente durante 10 horas, se lavaron con PBS cinco veces, después se tiñeron con Rh-faloidina a 4°C durante la noche seguido de la tinción nuclear con DAPI 4  $\mu$ M.

1. Ensayo de apoptosis

**[0336]** Este ensayo identifica factores que facilitan la supervivencia celular en una matriz 3-dimensional en presencia de factores de crecimiento exógenos (VEGF, bFGF sin PMA).

50 **[0337]** Un resultado positivo es igual o inferior a 1,0 =no hay apoptosis, 1 = menos de 20% de las células son

apoptóticas, 2=menos de 50% de las células son apoptóticas, 3=más de 50% de las células son apoptóticas. Los estimuladores de la apoptosis en este sistema se prevé que sean factores apoptóticos, y se prevé que los inhibidores evitan o reduzcan la apoptosis.

2. Ensayo de vacuolas

5 **[0338]** Este ensayo identifica factores que estimulan la formación de vacuolas endoteliales y la formación de lumen en presencia de bFGF VEGF-E (40 ng/ml).

**[0339]** Un resultado positivo es igual o superior a 2, 1=vacuolas presentes en menos de 20% de las células, 2=vacuolas presentes en 20% a 50% de las células,

10 3=las vacuolas se encuentran presentes en más de 50% de las células. Este ensayo está diseñado para identificar factores que están implicados en la estimulación de la pinocitosis, bombeo reducido, permeabilidad y formación de enlaces.

3. Ensayo de formación de tubo

15 **[0340]** El presente ensayo identifica factores que estimulan la formación del tubo endotelial en una matriz tridimensional. Este ensayo identifica factores que estimulan las células endoteliales para diferenciarse en una estructura de tipo tubo en una matriz tridimensional en presencia de factores de crecimiento exógenos (VEGF, bFGF).

20 **[0341]** Un resultado positivo es igual o superior a 2. 1 = todas las células son redondas, 2 = las células son alargadas, 3 = las células forman tubos con algunas conexiones, 4 = las células forman redes tubulares complejas. Este ensayo identificaría factores implicados en la estimulación de la migración, quimiotaxis o cambio de forma endotelial.

25 **[0342]** Se muestran los resultados en las figuras 3 a 5. La fig. 3A muestra la formación de tubo HUVEC en el caso de que no haya factores de crecimiento. La fig. 3B muestra el caso en que se encuentran presentes VEGF/bFGF y PMA, la fig. 3C muestra el caso en que se encuentra presentes VEGF y bFGF, la fig. 3D muestra el caso en que se encuentran presentes VEGF y PMA, la fig. 3E muestra el caso en que se encuentra presentes bFGF y PMA, la fig. 3F muestra el caso en que se encuentra presente VEGF, la fig. 3G muestra el caso en que se encuentra presente bFGF, y la fig. 3H muestra el caso en que PMA se encuentra presente.

30 **[0343]** Las figs. 4A y 4B muestran, respectivamente, el efecto sobre la formación de tubo HUVEC de VEGF-E-IgG a una dilución de 1% y de un control de tampón (HEPES 10 mM/NaCl 0,14 M/manitol al 4%, pH 6,8) a una dilución de 1%. Las figs. 5A y 5B muestran, respectivamente, el efecto sobre la formación de tubo HUVEC de VEGF-E-poli-His a una dilución de 1% y del control de tampón utilizado para VEGF-E-IgG a una dilución de 1%.

**[0344]** Los resultados muestran claramente formación de tubo más compleja en las muestras con VEGF-E-IgG y con VEGF-E-poli-his que en los controles con tampón.

EJEMPLO 9: ratones transgénicos

35 **[0345]** Se generaron ratones transgénicos mediante microinyección de embriones de ratón C57B1/6/SJL F2 (DNAX) con un vector adecuado para dicha microinyección que contenía el ADNc codificante de VEGF-E bajo el control de un promotor de queratina (Xie *et al.*, Nature 391:90-92, 1998) que controla la expresión en la piel.

**[0346]** Los cachorros transgénicos se encontraban arrugados y brillantes al nacer y se retrasó la aparición de pelo. Los ratones habían perdido su fenotipo alcanzadas las 2 semanas de edad. No se observaron cambios histopáticos detectables.

40 EJEMPLO 10: producción de anticuerpos

45 **[0347]** Se generaron antisueros policlonales en conejos New Zealand White hembra contra VEGF-E humano. Se homogeneizó la proteína con adyuvante completo de Freund para la inyección primaria y con adyuvante incompleto de Freund para todos los refuerzos posteriores. Para la inmunización primaria y el primer refuerzo, se inyectaron 3,3 µg por kg de peso corporal directamente en los nódulos linfáticos poplíteos, de acuerdo con Bennett *et al.*, J. Biol. Chem. 266:23060-23067, 1991, y "Production of Antibodies by Inoculation into Lymph Nodes" de Sigel Sinha y Vander Laan en Methods in Enzymology, vol. 93 (New York: Academic Press, 1983). Para todos los refuerzos posteriores, se inyectaron 3,3 µg por kg de peso corporal en sitios subcutáneos e intramusculares. Las inyecciones se realizaron cada 3 semanas, extrayendo muestras de sangre en las 2 semanas siguientes a cada inyección. Los antisueros policlonales obtenidos de esta manera contenían anticuerpos que se unían a VEGF-E, según revelaron los experimentos de inmunoprecipitación.

EJEMPLO 11: inhibición del crecimiento de células endoteliales estimulado por VEGF (células ACE)

**[0348]** Se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 500 células/pocillo por cada 100 microlitos células

5 endoteliales capilares corticales adrenales bovinas (células ACE) (de cultivo primario, máximo de 12 a 14 pases). Entre los medios de ensayo se incluían DMEM bajo en glucosa, suero bovino al 10%, glutamina 2 mM y 1X penicilina/estreptomicina/fungizona. Los pocillos de control incluían lo siguiente: (1) no adición de células ACE; (2) células ACE solas; (3) células ACE más 5 ng/ml de FGF; (4) células ACE más 3 ng/ml de VEGF; (5) células ACE más 3 ng/ml de VEGF más 1 ng/ml de TGF-beta, y (6) células ACE más 3 ng/ml de VEGF más 5 ng/ml de LIF. A continuación se añadió la muestra de ensayo, polipéptido VEGF-E etiquetado con poli-his (descrito en los Ejemplos, anteriormente; en volúmenes de 100 microlitros) a los pocillos (a diluciones de 1%, 0,1% y 0,01%, respectivamente). Los cultivos celulares se incubaron durante 6 a 7 días a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, los medios en los pocillos se aspiraron, y las células se lavaron 1X con PBS. A continuación, se añadió una mezcla de reacción de fosfatasa ácida (100 microlitros; acetato sódico 0,1 M, pH 5,5, Triton X-100 al 0,1%, fosfato de p-nitrofenilo 10 mM) a cada pocillo. Tras una incubación de 2 horas a 37°C, se detuvo la reacción mediante adición de 10 microlitros de NaOH 1 N. Se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a 405 nm.

10 [0349] Se calculó la actividad de VEGF-E como porcentaje de inhibición de proliferación estimulada por VEGF (3 ng/ml) (según se determinó mediante la actividad de fosfatasa ácida a DO de 405 nm) respecto a las células sin estimulación. Se utilizó TGF-beta como referencia de actividad - a 1 ng/ml, TGF-beta bloquea 70% a 90% de la proliferación de células ACE estimulada por VEGF. Los resultados de este ensayo se interpretaron como "positivos" si la inhibición observada era  $\geq 30\%$ .

15 [0350] En un primer ensayo, el VEGF-E a diluciones de 1%, 0,1% y 0,01% mostraron niveles de inhibición de 52%, 90% y 96%, respectivamente. En un segundo ensayo, VEGF-E a diluciones de 1%, 0,1% y 0,01% mostró niveles de inhibición de 57%, 93% y 91%, respectivamente.

#### Depósito de material

20 [0351] El material siguiente ha sido depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>Dep. ATCC nº</u>	<u>Fecha de depósito</u>
DNA 29101-1272	209653	5 de marzo de 1998

25 [0352] Dicho depósito se realizó bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patente y regulaciones de la misma (Tratado de Budapest). Éste garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito será puesto a disposición del público por parte de la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que garantiza la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito para el público tras la publicación de la patente US pertinente o tras abrir a inspección del público cualquier solicitud de patente US o extranjera, la que sea la primera, y garantiza la disponibilidad de la progenie a la persona que el U.S. Commissioner of Patents and Trademarks determinará que tiene el derecho a ello según la norma 35 USC § 122 y las normas del Comisario conforme a los mismos (incluyendo la norma 37 CFR §1.14, con referencia particular a 886 OG 638).

30 [0353] El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo del material en depósito muriese, se perdiese o fuera destruido mientras estuviese en cultivo bajo condiciones adecuadas, se reemplazará el material rápidamente con otro idéntico tras la notificación. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para la práctica de la invención en contra de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con la legislación en materia de patentes del mismo.

35 [0354] La memoria escrita se considera suficiente para que un experto en la materia sea capaz de poner en práctica la invención. La presente invención no debe considerarse limitada en su alcance a la interpretación dada, debido a que la realización presentada pretende ser sólo una de las posibilidades de determinados aspectos de la invención y cualquier variación que sea funcionalmente equivalente se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención. El depósito del material de la presente invención no constituye un reconocimiento de que la descripción escrita contenida en la presente memoria resulta inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo la mejor realización de la misma, ni debe interpretarse como limitativo del alcance de las reivindicaciones a los ejemplos específicos que representa. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquéllas mostradas y descritas en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo antagonista anti-VEGF-E para utilizar en un procedimiento de tratamiento del cáncer en un mamífero mediante la administración en serie o en combinación con un segundo agente, ya bien sea en la misma composición o en composiciones separadas, donde VEGF-E es el polipéptido VEGF-E de secuencia nativa de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 345 tal como se ilustran en la Figura 2 o una de sus formas truncada o secretada de origen natural o alternativamente procesada o alélica de la misma, y donde el anticuerpo antagoniza una o más de las siguientes actividades del VEGF-E:
- (i) estimulación del crecimiento selectivo y/o la supervivencia de las células endoteliales de la vena umbilical humana;
  - (ii) inducción del gen c-fos temprano inmediato en las líneas celulares endoteliales humanas;
  - 10 (iii) inducción de la hipertrofia de los miocitos en las células cardíacas; o
  - (iv) inhibición de la proliferación estimulada por VEGF de las células endoteliales capilares corticales adrenales.
- 15 2. Anticuerpo anti-VEGF-E según la reivindicación 1, donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico, un agente angiostático, un agente utilizado en radioterapia o un anticuerpo anti-VEGF.
3. Anticuerpo anti-VEGF-E según la reivindicación 2, donde el segundo agente es un agente angiostático.
4. Anticuerpo anti-VEGF-E según la reivindicación 3, donde el agente angiostático es un anticuerpo anti-VEGF.
5. Anticuerpo anti-VEGF-E según la reivindicación 1, donde el segundo agente es un antagonista FGF o un antagonista PDGF o un anticuerpo que se une a un receptor ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o VEGF.
- 20 6. Anticuerpo anti-VEGF-E según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo anti-VEGF-E humanizado.
7. Anticuerpo anti-VEGF-E según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mamífero es humano.
8. Anticuerpo anti-VEGF-E según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la actividad de:
- (i) estimular la supervivencia de las células endoteliales de la vena umbilical humana; o
  - 25 (ii) inducir la hipertrofia de los miocitos en las células cardíacas;
- se analiza utilizando una proteína de fusión VEGF-E-IgG codificada por una construcción de ácidos nucleicos que comprende el marco de lectura abierto para el VEGF-E contenido en la secuencia de la Fig. 1 frente al ácido nucleico codificante de la Fc de una IgG humana.
- 30 9. Anticuerpo anti-VEGF-E según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la actividad de inhibición de la proliferación estimulada por VEGF de las células endoteliales capilares corticales adrenales se analiza utilizando una proteína de fusión VEGF-E-His8 codificada por una construcción de ácidos nucleicos que comprende un marco de lectura abierto para VEGF-E contenido en la secuencia de la Fig.1 frente el ácido nucleico codificante del marcador His8.
- 35 10. Utilización de un anticuerpo antagonista anti-VEGF-E para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer en un mamífero, donde el anticuerpo y el tratamiento son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 40 11. Agente seleccionado a partir de un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico, un agente angiostático, un agente utilizado en radioterapia, un anticuerpo anti-VEGF, un antagonista FGF, un antagonista PDGF o un anticuerpo que se une a un receptor ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o VEGF para utilizar en un procedimiento destinado al tratamiento del cáncer en un mamífero mediante la administración en serie o en combinación con un anticuerpo antagonista anti-VEGF-E tal como se define en la reivindicación 1, ya bien sea en la misma composición o en composiciones separadas.
12. Agente según la reivindicación 11, donde el anticuerpo anti-VEGF-E es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 y 9.
- 45 13. Agente según la reivindicación 11 ó 12, que es tal como se define en la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
14. Agente según la reivindicación 13, donde el mamífero es humano.
15. Utilización de un agente seleccionado a partir de un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del

crecimiento, un agente citotóxico, un agente angiostático, un agente utilizado en radioterapia, un anticuerpo anti-VEGF, un antagonista FGF, un antagonista PDGF o un anticuerpo que se une a un receptor ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o VEGF para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer en un mamífero, donde el agente y el tratamiento son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 11-14.

GACGCGTGGGCGGACGCGTGGGCTGGTTCAGGTCCAGGTTTTGCTTTGATCCTTTTCAAA  
 AACTGGAGACACAGAAGAGGGGCTCTAGGAAAAAGTTTTGGATGGGATTATGTGGAAACTA  
 CCCTGCGATTCTCTCTGCCAGAGCAGGCTCGGGCGCTTCCACCCCAGTGCAGCCTTCCCC  
 TGGCGGTGGTGAAGAGACTCGGGAGTCGCTGCTTCCAAAGTGCCCGCCGTGAGTGAGCT  
 CTCACCCCAGTCAGCCAA

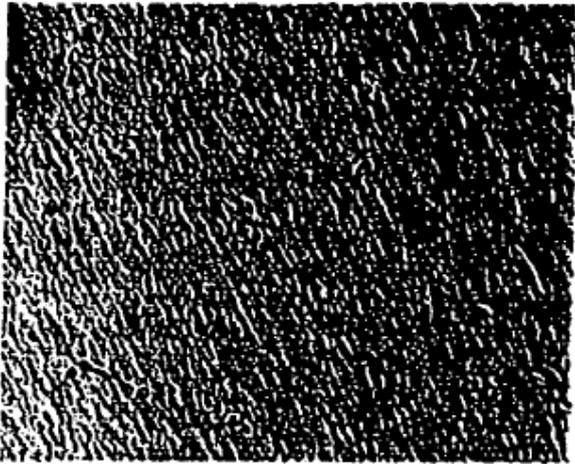
(ATGAGCCTCTTCGGGCTTCTCCTGCTGACATCTGCCCTGGCCGGCCAGAGACAGGGGACT  
 CAGGCGGAATCCAACCTGAGTAGTAAATTCAGTTTTCCAGCAACAAGGAACAGAACGGA  
 GTACAAGATCCTCAGCATGAGAGAATTACTGTGTCTACTAATGGAAGTATTCACAGC  
 CCAAGGTTTCCTCATACTTATCCAAGAAATACGGTCTTGGTATGGAGATTAGTAGCAGTA  
 GAGGAAAATGTATGGATACAACCTTACGTTTGATGAAAGATTTGGGCTTGAAGACCCAGAA  
 GATGACATATGCAAGTATGATTTTGTAGAAGTTGAGGAACCCAGTGATGGAACTATATTA  
 GGGCGCTGGTGTGGTCTGGTACTGTACCAGGAAAACAGATTTCTAAAGGAAATCAAAAT  
 AGGATAAGATTTGTATCTGATGAATATTTTCTTCTGAACCAGGGTTCTGCATCCACTAC  
 AACATTGTCATGOCACAATTCACAGAAGCTGTGAGTCCCTCAGTGCTACCCCTTCAGCT  
 TTGCCACTGGACCTGCTTAATAATGCTATAACTGCCTTTAGTACCTTGAAGACCTTATT  
 CGATATCTTGAACCAGAGAGATGGCAGTTGGACTTAGAAGATCTATATAGGCCAACTTGG  
 CAACTTCTTGGCAAGGCTTTTGTTTTTTGAAGAAAATCCAGAGTGGTGGATCTGAACCTT  
 CTAACAGAGGAGGTAAGATTTATACAGCTGCACACCTCGTAACTTCTCAGTGTCCATAAGG  
 GAAGAACTAAAGAGAACCGATACCATTTTCTGGCCAGGTTGTCTCCTGGTTAAACGCTGT  
 GGTGGGAACGTGTCCTGTGTCTCCACAATGCAATGAATGTCAATGTGTCCCAAGCAAA  
 GTTACTAAAAAATACCACGAGGTCCTTCAGTTGAGACCAAAGACCGGTGTGAGGGGATTG  
 CACAAATCACTCACCGACGTGGCCCTGGAGCACCATGAGGAGTGTGACTGTGTGTGCAGA  
 GGGAGCACAGGAGGATAGCCGCATCACACCAGCAGCTCTTGGCCAGAGCTGTGCAGTGC  
 AGTGGCTGATTCTATTAGAGAACGTATGCGTATCTCCATCCTTAATCTCAGTTGTTTGC  
 TTCAAGGACCTTTCATCTTCAGGATTTACAGTGCATTCTGAAAGAGGAGACATCAAACAG  
 AATTAGGAGTTGTGCAACAGCTCTTTTGAAGAGGAGGCTAAAGGACAGGAGAAAAGGTCT  
 TCAATCGTGGAAAGAAAATTAATGTTGTATTAATAGATCACAGCTAGTTTCAGAGTT  
 ACCATGTACGTATTCACCTAGCTGGGTTCTGTATTTTCAGTTCCTTTCGATAACGGCTTAGGG  
 TAATGTACGTACAGGAAAAAACTGTGCAAGTACAGCACCTGATTTCGGTTCCTTGCCTTAA  
 CTCTAAAGCTCCATGTCTCTGGGCCTAAAATCGTATAAAAATCTGGATTTTTTTTTTTTTT  
 TTGCTCATATTCACATATGTAAACCAGAACATTCATGTACTACAAACCTGGTTTTTAAA  
 AAGGAACTATGTTGCTATGAATTAACCTTGTGTCTGCTGATAGGACAGACTGGATTTT  
 CATATTTCTTATTAATAATTTCTGCCATTTAGAAGAAGAGAACTACATTCATGGTTTGAA  
 GAGATAAACCTGAAAAGAAGAGTGGCCTTATCTTCACTTTATCGATAAGTCAGTTTATTT  
 GTTTCATTGTGTACATTTTATATTTCTCTTTTIGACATTATAACTGTGGCTTTTCTAAT  
 CTGTAAATATATCTATTTTACCAAAGGTATTTAATATCTTTTTTATGACAACCTTAG  
 ATCAACTATTTTLAGCTTGGTAAATTTTTCTAAACACAATGTTATAGCCAGAGGAACAA  
 AGATGATATAAAATATTGTGTCTGACAAAAATACATGTATTTTCATTCCTGATGGTGC  
 TAGAGTTAGATTAATCTGCATTTTAAAAAAGTGAATGGAATAGAATTGGTAAGTTGCAA  
 AGACTTTTTGAAAATAATTAATTTATCATATCTTCCATTCCGTGTTATGGAGATGAAAAT  
 AAAAAGCAACTTATGAAAGTAGACATTCAGATCCAGCCATTACTAACCTATTCCTTTTTT  
 GGGGAAATCTGAGCCTAGCTCAGAAAAACATAAAGCACCTTGAAAAAGACTTGGCAGCTT  
 CCTGATAAAGCGTGTCTGTGTCAGTAGGAACACATCCCTATTTATGTGATGTTGTGG  
 TTTTATTATCTTAAACTCTGTCCATACACTTGTATAAATACATGGATTTTTTATGTAC  
 AGAAGTATGTCCTTAAACCAGTTCACTTATGTACTCTGGCAATTTAAAAGAAAATCAGT  
 AAAATATTTGCTTGTAAAATGCTTAATATNGTGCCTAGGTTATGTGGTACTATTGAA  
 TCAAAAATGTATGAAATCATCAATAAAAAGATGTGGCTATTTTGGGGAGAAAATTA  
 AAAAAAAGGTTTAGGGATAACAGGGTAATGCGGCCG SEQ. ID NO:1

FIG. 1

MSLFGLLLLSALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHS  
PRFPHTYPRNTVLVWRLVAVEENVWIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPSDGTIL  
GRWCGSGTVPKGQISKGNQIRIRFVSDEYFPSEPGFCIHYNIVMPQFTEAVSPSVLPPSA  
LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLGKAFVFGKRKSRVVDLNL  
LTEEVRLYSCTPRNFSVSI REELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVP SK  
VTKKYHEVLQLRPKTGVRGLHKS LTDVALEHHEECDVCRCGSTGG SEQ. ID NO:2

**FIG. 2**

sin factor o factores de crecimiento



**FIG. 3A**

vegf/bfgf/pma



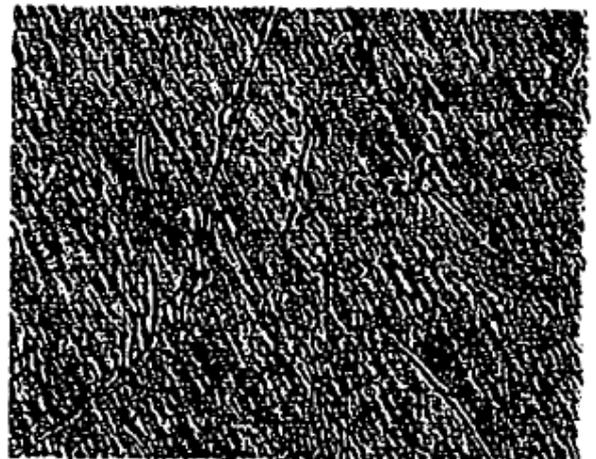
**FIG. 3B**

vegf/btgf



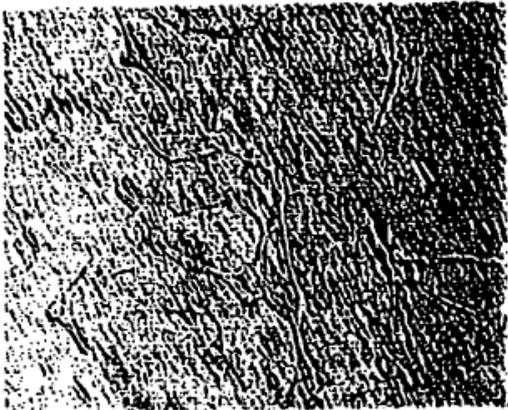
**FIG. 3C**

vegf/pma



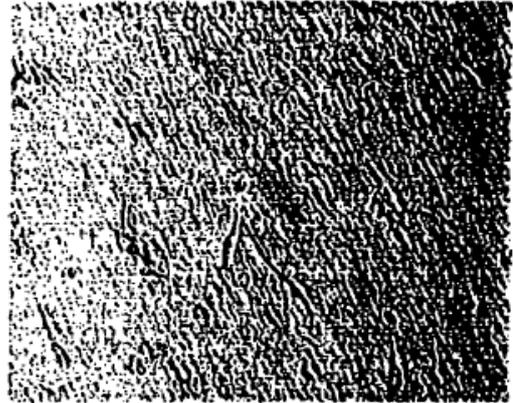
**FIG. 3D**

bfgf/pma



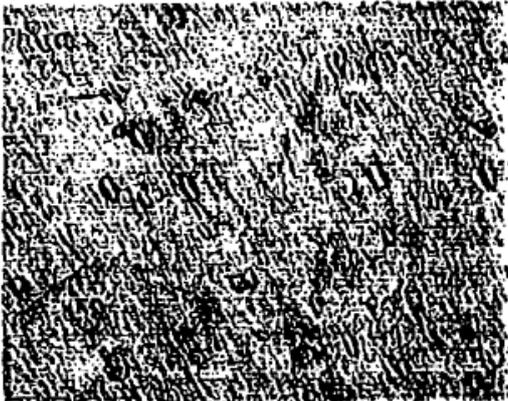
**FIG. 3E**

vegf



**FIG. 3F**

bfgf



**FIG. 3G**

pma



**FIG. 3H**

VEGF-E-IgG, dilución del 1%

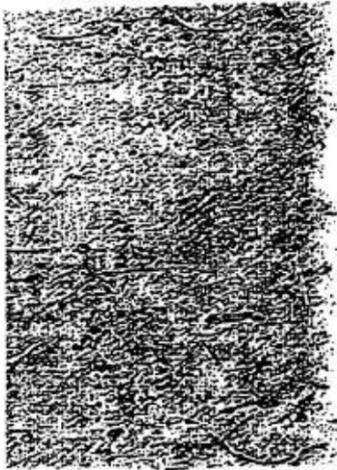


FIG. 4A

Control de tampón, dilución del 1%



FIG. 4B

VEGF-E-poli-His, dilución del 1%

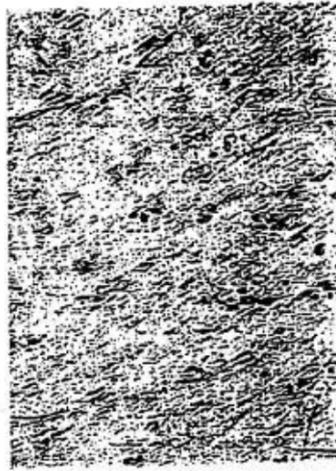


FIG. 5A

Control de tampón, dilución del 1%

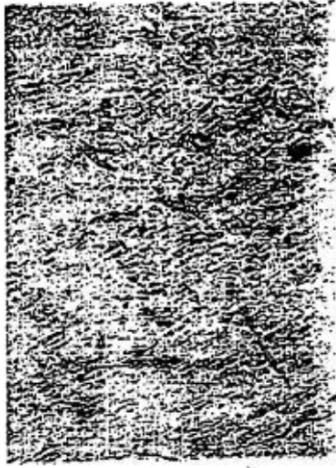


FIG. 5B