

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 253**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2007 E 07811137 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2054082**

54 Título: **Uso de antagonistas de DII4 en lesión isquémica o insuficiencia vascular**

30 Prioridad:

07.08.2006 US 836003 P

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

14.03.2013

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 OLD SAW MILL RIVER ROAD
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**WIEGAND, STANLEY, J.;
PAPADOPOULOS, NICHOLAS, J. y
LOBOV, IVAN, B.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 398 253 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

Uso de antagonistas de Dll4 en lesión isquémica o insuficiencia vascular

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere, en líneas generales, al tratamiento de trastornos vasculares e isquémicos administrando composiciones que inhiben la interacción de Dll4 con receptores Notch y/o la activación de receptor Notch. Más específicamente, esta invención se refiere al tratamiento de trastornos vasculares y/o isquémicos del ojo administrando composiciones que inhiben la interacción de Dll4 con receptores Notch.

Antecedentes

15 La angiogénesis es un proceso fundamental requerido para el desarrollo y el crecimiento normales de tejidos y órganos e implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis y la homeostasis de vasos sanguíneos están estrechamente controladas a través de un sistema altamente regulado de moduladores angiogénicos. La desviación de un control tan estrecho con frecuencia conduce a o está asociado con enfermedad.

20 Aunque la angiogénesis "excesiva" o anormal no regulada es característica de numerosos estados patológicos, la angiogénesis insuficiente, la pérdida de vasos sanguíneos o la oclusión funcional o estructural de vasos sanguíneos también puede ser un grave problema médico. Es deseable promover la angiogénesis y/o prevenir la regresión de vasos sanguíneos existentes en situaciones en las que el tejido se convierte en isquémico, por ejemplo, en isquemia retiniana, cerebral, cardiovascular y de extremidades y en afecciones en las que tiene que establecerse, re-establecerse, aumentarse o expandirse el suministro vascular, por ejemplo, en la cicatrización y después de trasplante de tejidos u órganos o para estimular el establecimiento de vasos colaterales o aumentar de otro modo la perfusión de un tejido u órgano con circulación inadecuada.

30 La ruta de señalización de Notch es un sistema para la comunicación célula a célula usado por una amplia variedad de eucariotas para muchos procesos biológicos, tales como diferenciación, proliferación y homeostasis (Artavanis-Tsakonas *et al.* (1999) *Science* 284: 770-776). La señalización de Notch también se ha implicado en el control del desarrollo vascular (Iso *et al.* (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 543-553).

35 El tipo delta (Dl4) o ligando de tipo delta 4 (Dll4) (en lo sucesivo en este documento, "Dll4") es un miembro de la familia Delta de ligandos de Notch que muestra una expresión altamente selectiva por el endotelio vascular (Shutter *et al.* (2000) *Genes Dev.* 14: 1313-1318). El Dll4 es un ligando para receptores Notch, incluyendo Notch1 y Notch4. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos para Dll4 humano y de ratón se muestran respectivamente en las SEC ID N°: 1-2 y SEC ID N°: 3-4. Se han generado ratones Dll4 con modificación génica dirigida (véase, por ejemplo, Duarte *et al.* (2004) *Genes Dev.* 18: 2474 - 2478; Krebs *et al.* (2004) *Genes Dev.* 18: 2469 - 2473; Gale *et al.* (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15949-15954). Estos estudios mostraron que Dll4 estaba altamente expresado en vasos sanguíneos en desarrollo en el embrión de ratón y que la delección genética de incluso un único alelo de Dll4 dio como resultado mortalidad embrionaria asociada con anomalías vasculares marcadas.

45 El documento US 2006/134121 desvela antagonistas, ensayos y métodos terapéuticos de Dll4. El documento US 2006/030529 desvela el uso de inhibidores de VEGF para el tratamiento de trastornos del ojo. El documento WO 2007/028110 desvela métodos para usar e identificar moduladores de tipo delta 4. El documento WO 2007/143689 desvela composiciones y métodos para modular el desarrollo vascular.

Breve resumen de la invención

50 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades que afectan al sistema cardiovascular con agentes capaces de bloquear la interacción de Dll4 con sus receptores ("antagonistas de Dll4"). Los resultados experimentales proporcionados en este documento respaldan el uso de antagonistas de Dll4 para tratar enfermedades caracterizadas por la neovascularización patológica y la insuficiencia vascular, donde la insuficiencia vascular se debe a la pérdida de vasos sanguíneos o cambios vasculares funcionales que dan como resultado perfusión tisular insuficiente. Los antagonistas de Dll4 son particularmente útiles para tratar trastornos vasculares del ojo, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad y otras enfermedades oculares caracterizadas por angiogénesis patológica y/o isquemia retiniana, tales como oclusión de vena o arteria retiniana.

60 La invención proporciona el uso de un antagonista de ligando de tipo delta 4 (Dll4) en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir la pérdida de vasos sanguíneos o para promover la angiogénesis productiva, o ambos, en un sujeto que tiene una lesión isquémica o insuficiencia vascular en el que el antagonista de Dll4 comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a Dll4 y bloquea la unión de Dll4 a un receptor Notch o que comprende el dominio extracelular de Dll4, conectado opcionalmente a un componente multimerizante. La invención también proporciona un antagonista de ligando de tipo delta 4 (Dll4) para el uso en la prevención o reducción de la pérdida de vasos sanguíneos o promoción de angiogénesis productiva, o

ambas, en un sujeto que tiene una lesión isquémica o insuficiencia vascular, en el que el antagonista de Dll4 comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a Dll4 y bloquea la unión de Dll4 a un receptor Notch o que comprende el dominio extracelular de Dll4, conectado opcionalmente a un componente multimerizante.

5 Se demuestra que la inhibición farmacológica de Dll4 ejerce varios efectos beneficiosos en un modelo de retinopatía isquémica, que incluyen atenuación de la pérdida de vasos sanguíneos cuando se aplica en el momento de una lesión que conduce a pérdida de vasos sanguíneos y supresión del desarrollo de cambios patológicos en la vasculatura mientras que se aumenta la regeneración de vasos sanguíneos funcionales más normales cuando se aplica después del establecimiento de la isquemia.

15 Se espera que los agentes farmacológicos que inhiben la señalización de Dll4 sean similarmente beneficiosos al tratar otras formas de lesión isquémica, que incluyen isquemia cerebral, isquemia cardiaca y afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y otros órganos o tejidos corporales. También se espera que los inhibidores de Dll4 sean clínicamente beneficiosos en otras afecciones que requieran el establecimiento o el re-establecimiento de un suministro vascular o que se beneficiarían de otro modo de la perfusión tisular aumentada. Son ejemplos de tales afecciones las malformaciones arteriovenosas, cicatrización, trasplante de órganos o tejidos e insuficiencia placentaria. Como se muestra en el trabajo experimental indicado más adelante, la inhibición de Dll4 previene el estrechamiento y la oclusión arterial, indicando que los inhibidores de Dll4 también serían eficaces en el tratamiento de hipertensión sistémica o pulmonar y trastornos relacionados.

20 Ahora se demuestra que los antagonistas de Dll4 son eficaces en la promoción de la angiogénesis productiva tanto en estados normales como en afecciones patológicas. Específicamente, se demuestra que el bloqueo de la señalización de Dll4-Notch mejora la brotación angiogénica y la proliferación de células endoteliales vasculares en la vasculatura retiniana en desarrollo y suprime la formación de neovascularización ectópica patológica y el desarrollo de derivaciones arteriovenosas en favor de formación de vasos más apropiada en la retina isquémica. Además, se demuestra que la aplicación de bloqueantes de Dll4 en el momento de la lesión vascular reduce marcadamente la pérdida posterior de vasos sanguíneos. Estos hallazgos respaldan el uso de un antagonista de Dll4 en el tratamiento de enfermedades del ojo caracterizadas por anomalías vasculares, especialmente cuando están acompañadas de isquemia y pérdida de vasos normales. Los ejemplos de tales enfermedades del ojo incluyen retinopatías isquémicas, tales como degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena retiniana central u oclusión de rama de vena retiniana, retinopatía diabética y retinopatía de prematuridad.

35 En este documento se describe también un procedimiento de tratamiento de un trastorno o una enfermedad del ojo caracterizada por anomalías vasculares, que comprende administrar un antagonista de Dll4 a un sujeto que lo necesite. El método promueve el crecimiento de vasos normales funcionales, inhibe el crecimiento de vasos anormales o alterados y previene la regresión patológica de vasos sanguíneos.

40 En una realización, el antagonista de Dll4 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a Dll4 y que bloquea la unión de Dll4 a un receptor Notch (por ejemplo, receptores Notch1 y Notch4). En otra realización, el antagonista de Dll4 es una proteína o un fragmento proteico que comprende el dominio extracelular de Dll4 o un fragmento del mismo, que, en realizaciones específicas, puede estar fusionado a un componente multimerizante y que se une a los receptores Notch sin activar los mismos, bloqueando de este modo las acciones de Dll4 endógeno.

45 El trastorno o la enfermedad del ojo tratada mediante el método es un trastorno de la vasculatura ocular caracterizado por la presencia de vasos anormales y/o pérdida de vasos normales o de la función normal de los vasos. En realizaciones específicas, la afección o el trastorno tratado incluye retinopatía de prematuridad, retinopatía isquemia, oclusión de vena o arteria retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante corneal.

50 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo usado en el método puede ser policlonal o monoclonal y puede estar humanizado, ser quimérico o ser completamente humano. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal completamente humano. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla, ScFv, un Fab o un F(ab')₂.

60 Cuando el antagonista de Dll4 es una proteína o un fragmento proteico, el fragmento es preferentemente el dominio extracelular de Dll4 o un fragmento o fragmento modificado del mismo y puede estar fusionado a un componente multimerizante. El componente multimerizante es preferentemente un dominio de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, un dominio Fc, por ejemplo, un Fc humano (SEC ID N°: 5). La proteína puede comprender opcionalmente una secuencia señal que puede ser nativa de la célula, recombinante o sintética.

65 En un aspecto más amplio, el método es útil para tratar cualquier enfermedad o afección isquémica causada por un suministro de sangre insuficiente debido a pérdida de vasos sanguíneos y/o mala perfusión, por ejemplo, lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardiaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades u otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización, trasplante de órganos o tejidos, insuficiencia

placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis e hipertensión sistémica o pulmonar.

En este documento se describe también el uso de un agente capaz de inhibir la actividad de Dll4 en la fabricación de un medicamento para tratar, inhibir o mitigar un trastorno isquémico o vascular, en el que el antagonista de Dll4 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de bloquear la unión de Dll4 a un receptor Notch o un fragmento de Dll4 conectado opcionalmente a un componente multimerizante (tal como un dominio Fc). En una realización, el trastorno isquémico o vascular es una enfermedad o afección del ojo caracterizada por la presencia de vasos sanguíneos anormales y/o pérdida de vasos sanguíneos normales o de función vascular. La enfermedad del ojo es retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión de vena o arteria retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante corneal.

En otra realización, el trastorno isquémico o vascular es lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardiaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades u otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización, trasplante de órganos o tejidos, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis o hipertensión sistémica o pulmonar.

Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

20 Breve resumen de las figuras

Figura 1. La delección genética de un único alelo de Dll4 aumentó los números de brotes angiogénicos en la vasculatura retiniana en desarrollo. El número de brotes se cuantificó en campos de microscopía 100X. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel $p < 0,00001$.

Figura 2. El suministro intraocular de Dll4-Fc aumentó los números de células positivas a BrdU en proliferación en la vasculatura retiniana en desarrollo. Se inyectaron 4,15 μm de mDll4-hFc o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en crías de ratón de 7 días de edad. La vasculatura retiniana se analizó 24 horas después. El número de células positivas a BrdU se cuantificó en campos de microscopía 200X. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel $p < 0,05$.

Figura 3A-B. El suministro intraocular de Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 promueve la regeneración de vasos retinianos en ratones con retinopatía isquémica inducida por oxígeno (OIR). (A) Se inyectaron 0,48 μm de mDll4-hFc o 0,5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en crías con OIR de 13 días de edad (día postnatal 13 o P13). La vasculatura retiniana se analizó en P17. (B) Se inyectaron 2,55 μm de anticuerpo policlonal de conejo anti-mDll4 o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P13. La vasculatura retiniana se analizó en P17. Se midieron las áreas avasculares en preparaciones retinianas en plano. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles $p < 0,0001$ (A) y $p < 0,05$ (B).

Figura 4A-B. El suministro intraocular de Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 mitiga la formación de neovascularización patológica en OIR. (A) Se inyectaron 0,48 μm de mDll4-hFc o 0,5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P13. La vasculatura retiniana se analizó en P17. (B) Se inyectaron 2,55 μm de anticuerpo policlonal de conejo anti-mDll4 o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P13. La vasculatura retiniana se analizó en P17. Se midieron las áreas vasculares anormales (áreas que contenían "penachos" vasculares ectópicos) en preparaciones retinianas en plano. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles $p < 0,0001$ (A) y $p < 0,05$ (B).

Figura 5. El suministro intraocular de Dll4-Fc mejora la perfusión retiniana. Se inyectaron 0,48 μm de mDll4-hFc o 0,5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P13. En P17, los animales se perfundieron con lectina de tomate marcada con Rojo Texas y la vasculatura retiniana se analizó en P17. Se midieron las áreas vasculares no perfundidas en preparaciones retinianas en plano. Los resultados fueron significativos en el nivel $p < 0,0005$.

Figura 6A-B. El suministro intraocular de Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 reduce la hipoxia/isquemia retiniana. (A) Se inyectaron 4,1 μm de hDll4-hFc o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P12. Se inyectó Hypoxyprobe™-1 por vía intraperitoneal una hora antes de eutanasiar a los animales. La vasculatura retiniana se analizó en P17. Se midieron las áreas marcadas con Hypoxyprobe en preparaciones retinianas en plano. (B) Se inyectaron 2,55 μm de anticuerpo policlonal de conejo anti-mDll4 o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P13. Se inyectó Hypoxyprobe™-1 por vía intraperitoneal una hora antes de eutanasiar a los animales. La vasculatura retiniana se analizó en P17. Se midieron las áreas marcadas con Hypoxyprobe en preparaciones retinianas en plano. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles $p < 0,001$ (A) y $p < 0,05$ (B).

Figura 7. La delección genética de un único alelo de Dll4 reduce la pérdida de vasos sanguíneos inducida por exposición a hiperoxia. Se pusieron ratones Dll4^{+lacZ} y de control de tipo silvestre (WT) de la misma camada en la cámara de oxígeno al 75% en P7. La vasculatura retiniana se analizó en preparaciones en plano en P12. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles $p < 0,05$.

Figura 8A-B. El suministro intraocular de Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 reduce o previene la pérdida de vasos sanguíneos inducida por exposición a hiperoxia. (A) Se inyectaron 4,1 μm de hDll4-hFc o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P8. Las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% en P9. La vasculatura de las retinas se analizó en P10. (B) Se inyectaron 2,55 μm de anticuerpo policlonal de conejo anti-mDll4 o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P8. Las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% en P9. La vasculatura retiniana se analizó en P10. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles $p < 0,00001$ (A) y $p < 0,0001$ (B).

Figura 9A-B. El suministro intraocular de Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 reduce la oclusión de vasos retinianos. (A) Se inyectaron 4,1 μm de hDll4-hFc o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P8. Las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% en P9. Las crías se perfundieron con lectina fluorescente y la vasculatura retiniana se analizó en P10. (B) Se inyectaron 2,55 μm de anticuerpo policlonal de conejo anti-mDll4 o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea en P8. Las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% en P9. Las crías se perfundieron con lectina fluorescente y se analizó la vasculatura retiniana en P10. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles $p < 0,00001$ (A) y $p < 0,0001$ (B).

Figura 10. El suministro sistémico de Dll4-Fc reduce o previene la pérdida de vasos sanguíneos retinianos. Se inyectaron 4,1 μm de hDll4-hFc o 5 μm de proteína de control hFc humana por vía intravítrea (ITV) o se inyectó hDll4-hFc por vía intraperitoneal a una dosis de 25 mg por kg de peso corporal en P7. Las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% en P8. La vasculatura retiniana se analizó en P9. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel $p < 0,0001$.

Descripción detallada

Antes de que se describan los presentes métodos, ha de entenderse que esta invención no está limitada a métodos particulares y las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares y no debe entenderse como limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado como un experto habitual en la materia, a la que pertenece esta invención, comprende comúnmente. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferentes.

Definiciones

Con la expresión "antagonista de Dll4" se quiere decir un agente capaz de inhibir la actividad biológica de Dll4 bloqueando la interacción de Dll4 con sus receptores. La inhibición de la actividad de Dll4 puede ser a través de inhibición de la activación de receptor con un anticuerpo para Dll4 o con un análogo o fragmento de Dll4 que se una, pero que no active el receptor (unión no productiva). Los inhibidores comunes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, receptores solubles, aptámeros de oligonucleótido, péptidos u otros antagonistas de molécula pequeña y sus derivados y ligandos de Dll4 modificados que se unen a su receptor Notch pero que son incapaces de activar la señalización a través de tal unión. Otras estrategias incluyen la interferencia con la expresión del gen que codifica Dll4 o el bloqueo de la activación del receptor Notch, por ejemplo, con ARNiP o con inhibidores de gamma secretasa, respectivamente.

Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante" tiene por objeto referirse a un anticuerpo cuya unión a Dll4 da como resultado la inhibición de la actividad biológica de Dll4. Esta inhibición de la actividad biológica de Dll4 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de Dll4. Estos indicadores de la actividad biológica de Dll4 pueden evaluarse por uno o más de varios ensayos convencionales *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica (véase ejemplos a continuación). Preferentemente, la capacidad de un anticuerpo de neutralizar la actividad de Dll4 se evalúa mediante inhibición de la unión de Dll4 a un receptor Notch, tal como Notch1 y Notch4.

Descripción general

Las rutas de señalización de Notch están conservadas evolutivamente y desempeñan papeles clave en la determinación del destino celular y la diferenciación en muchos tejidos durante el desarrollo embrionario y posnatal. Los componentes principales de la ruta de Notch se expresan en la vasculatura y la delección genética de ciertos componentes de la ruta de Notch incluyendo Notch1, Notch1/Notch4, Jagged1, Dll1, Dll4, Hey1/Hey2 o presenilinas, da como resultado mortalidad embrionaria asociada con defectos de remodelado vascular. Aunque la mayoría de estos genes se expresan en múltiples tipos tisulares y celulares, Dll4 está restringido en gran medida al endotelio vascular, sugiriendo que Dll4 es un ligando clave para los receptores Notch en la vasculatura.

Durante el desarrollo embrionario temprano, la delección genética de incluso un único alelo de Dll4 produce anomalías vasculares graves que dan como resultado mortalidad embrionaria en la mayoría de las cepas de

ratón. De hecho, entre los muchos genes implicados en la vasculogénesis y la angiogénesis, se ha descrito que la insuficiencia haploide da como resultado graves defectos vasculares y mortalidad embrionaria solamente para Dll4 y VEGF-A. La mortalidad embrionaria temprana impide la mayoría de las manipulaciones experimentales, haciendo difícil comprender precisamente el papel de Dll4 durante el desarrollo vascular y en situaciones patológicas.

Para superar esta limitación se estudiaron los efectos de la delección del gen de Dll4 en ratones de la cepa ICR, en la que la insuficiencia haploide produce solo mortalidad embrionaria limitada. El fenotipo vascular observado en estos ratones mutantes se comparó con el obtenido en ratones de tipo silvestre en los que la señalización de Dll4/Notch estaba inhibida selectivamente por inyección intravítrea de un inhibidor soluble de Dll4, Dll4-Fc o un anticuerpo policlonal neutralizante contra el dominio extracelular de Dll4. Para estos experimentos se seleccionó la retina como un sistema de modelo en el que estudiar la biología de Dll4, debido a que la vasculatura retiniana se desarrolla postnatalmente de una manera estereotípica que está altamente organizada, temporal y espacialmente.

El modelo murino de retinopatía isquémica inducida por oxígeno (OIR) es un modelo bastante caracterizado de neovascularización patológica asociada con expresión elevada del factor pro-angiogénico esencial, VEGF (Smith *et al.* 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 101-111; Neely *et al.* 1998 Am J. Pathol 153: 665-670; Saint-Geniez *et al.* 2004 Int J Dev Biol 48: 1045-1058) y, por tanto, pertinente para la angiogénesis patológica asociada con diversas afecciones patológicas (Ferrara *et al.* 2005 Nature 438: 967-974). Finalmente, la vasculatura retiniana es fácilmente accesible para manipulaciones experimentales, que incluyen microinyecciones intravítreas de agentes experimentales.

Los experimentos descritos a continuación muestran que durante el desarrollo vascular retiniano normal y en el modelo de OIR, la supresión farmacológica de la señalización de Dll4/Notch aumenta marcadamente la brotación angiogénica y promueve la formación de una red capilar primaria más densa. De modo coherente con esto, se halló que la expresión de Dll4 endógeno es particularmente destacada en las regiones más activas del crecimiento vascular tanto durante el desarrollo normal como en el modelo de OIR. Además, la inhibición de Dll4 suprimió marcadamente la formación de la vasculatura anormal y evitó la oclusión y regresión de vasos sanguíneos.

Antagonistas de Dll4

Los antagonistas de Dll4 incluyen anticuerpos para Dll4 y fragmentos de los mismos capaces de bloquear la unión de Dll4 a un receptor Notch, por ejemplo, Notch1, y proteínas o fragmentos proteicos que comprenden el dominio extracelular de Dll4 que se pueden fusionar a un componente multimerizante; péptidos y peptidocuerpos (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2003/0229023 Oliner *et al.*).

Anticuerpos de Dll4. La expresión "inmunoglobulina o anticuerpo" como se usa en este documento se refiere a un polipéptido o una proteína de mamífero, incluyendo de ser humano, que comprende una región marco conservada de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente a y que reconoce un anticuerpo que, en el caso de la presente invención, es una proteína de Dll4 o una porción de la misma. Si el anticuerpo o la proteína de tipo anticuerpo pretendida se usará como un producto terapéutico de mamífero, las regiones de unión a inmunoglobulinas deben obtenerse de las correspondientes inmunoglobulinas de mamífero. Si la molécula tiene por objeto el uso no terapéutico, tal como para diagnóstico y ELISA, las regiones de unión a inmunoglobulina pueden obtenerse de mamíferos humanos o no humanos, tales como ratones. Los genes o fragmentos génicos de inmunoglobulina humana incluyen las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mi (μ) así como la miriada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mi, alfa, delta o epsilon que, a su vez, definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de cada clase de IgG existen diferentes isotipos (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, etc.) así como alotipos de los mismos.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ilustrativa de IgG humana comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena ligera (aproximadamente 25 kD) y una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. Las expresiones "cadena ligera variable" (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bastante caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)₂, un dímero de Fab que por sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H por un enlace disulfuro. El F(ab)₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero de F(ab)₂ en un monómero de Fab'. El monómero de Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra. Aunque se describen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto entenderá que tales fragmentos se pueden sintetizar de nuevo químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en este documento, incluye también fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros o los sintetizados de nuevo usando metodologías de ADN recombinante o

generados mediante bibliotecas de presentación tales como fago, *E. coli* o bibliotecas de presentación en levadura (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.* (1990) Nature 348: 552-554).

Análogos o fragmentos proteicos de Dll4. El antagonista de Dll4 puede ser un fragmento de Dll4 conectado opcionalmente a un componente multimerizante. En realizaciones específicas, un fragmento de Dll4 puede fusionarse a un componente multimerizante tal como un dominio de inmunoglobulina, un dominio de inmunoglobulina truncado o una secuencia de aminoácidos entre 1 y aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, que comprende opcionalmente al menos un resto de cisteína. En una realización preferente, el componente multimerizante es un dominio de inmunoglobulina, preferentemente un dominio Fc, por ejemplo, un Fc humano (SEC ID N°: 5). La proteína o el fragmento proteico puede comprender opcionalmente una secuencia señal, que puede comprender cualquier secuencia conocida por un experto para dirigir la secreción de un polipéptido o una proteína de una célula, incluyendo secuencias naturales o sintéticas. Generalmente se pone una secuencia señal al comienzo o en el extremo amino de la proteína de fusión. Tal secuencia señal puede ser nativa de la célula, recombinante o sintética.

El dominio extracelular de Dll4 está compuesto de un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) y ocho repeticiones en tándem de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF). Generalmente, los dominios de EGF se reconocen como aparecen aproximadamente en la posición 218-251 (dominio 1), 252-282 (dominio 2), 284-322 (dominio 3), 324-360 (dominio 4) y 362-400 (dominio 5), con el dominio de DSL aproximadamente en la posición 173-217 y el dominio N terminal aproximadamente en la posición 27-172 de hDll4 (SEC ID N°: 2). En realizaciones específicas, el antagonista de Dll4 comprende aproximadamente los aminoácidos 27-172, 27-217, 218-400, 218-360, 218-322 o 218-282 de la SEC ID N°: 2, fusionado opcionalmente a hFc (SEC ID N°: 5).

Métodos de administración

La presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente descrito en este documento. En un aspecto preferente, el agente está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o que producen efectos secundarios deseados). El sujeto es preferentemente un animal, por ejemplo, tal como una vaca, cerdo, caballo, pollo, gato, perro, etc. y preferentemente es un mamífero y mucho más preferentemente un ser humano. En una realización específica puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en este documento localmente al área que necesita tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo y no a modo de limitación, mediante infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, a través de inyección, mediante un catéter o mediante un implante.

Los métodos descritos en este documento pueden llevarse a cabo ventajosamente mediante administración al área que necesita tratamiento mediante administración local, incluyendo administración intravítrea, intraocular, perocular, subconjuntival, yuxtaescleral, subtenoniana o tópica.

Terapias de combinación

En diversas realizaciones, el método descrito en este documento se consigue con un antagonista de Dll4, tal como un anticuerpo de Dll4, en combinación con uno o más compuestos o terapias o procedimientos médicos adicionales. Por ejemplo, los agentes terapéuticos adecuados para el uso en combinación, de forma alterna o simultánea, incluyen proteínas de fusión capaces de unirse e inhibir la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (véase los documentos U.S. 7.070.959 y 7.087.411), agentes inmunosupresores tales como corticosteroides, dexametasona, ciclosporina A, FK506 o agentes antimetabólicos (véase Barker, NH, *et al.*, (2000) Clin Exp Ophthal 28: 357-360). Otros agentes terapéuticos adecuados para el uso en combinación, de forma alterna o simultánea, con antagonistas de Dll4 pueden incluir agentes que pueden bloquear la actividad biológica de otros miembros de la familia de VEGF, tales como VEGF-C y VEGF-D.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas de cómo preparar y usar los métodos y las composiciones de la invención y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado intentos de garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, mediciones de área, etc.), pero pueden existir algunos errores y desviaciones experimentales.

Ejemplo 1. Efecto de delección genética de un único alelo de Dll4 en la brotación de vasos sanguíneos en la vasculatura retiniana en desarrollo.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de la deficiencia genética parcial de Dll4 en la brotación de vasos sanguíneos durante la angiogénesis retiniana en desarrollo normal.

Animales. Se usó la tecnología Velocigene™ (Valenzuela *et al.* (2003) Nat. Biotechnol. 21: 652-9; Patente de

Estados Unidos 6.586.251) para sustituir toda la región codificante de Dll4 con el gen indicador de β -galactosidasa en células madre embrionarias de ratón de híbrido C57BL/6:129. Los machos quiméricos se cruzaron con hembras ICR. Se usaron para este estudio ratones Dll4^{+lacZ} sometidos a retrocruzamiento durante 3 generaciones con ICR (87,5% de ICR).

5 Histoquímica e inmunotinción. Las crías de ratón se eutanasiaron humanamente en P7. Se enuclearon los ojos y se diseccionaron las retinas, se fijaron durante una noche con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con lectina I de *Griffonia simplicifolia* (GS) marcada con FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se montaron en plano. Se tomaron imágenes usando un microscopio Nikon (Melville, NY).

10 Cuantificaciones. Se realizaron mediciones usando el software Scion Image. Cada estado experimental se ensayó al menos por triplicado. Se usaron el ensayo t de Student y el análisis de varianza de dos vías para evaluar la significación estadística.

15 Resultados. El plexo periférico era mucho más denso en ratones Dll4^{+lacZ} que en cachorros de la misma camada de tipo silvestre. Las vistas de mayor aumento resaltaron que el plexo periférico más denso en las retinas de ratones Dll4^{+lacZ} consistía en capilares que eran mayores en diámetro, estaban más intensamente interconectados e hiperperfundidos, de tal manera que en algunas áreas los vasos se fundieron hasta formar un sincitio, y, además, había muchos más brotes en el frente de crecimiento (Figura 1); también se observaron filopodios en partes más
20 internas del plexo a una frecuencia superior a la normal. Los análisis cuantitativos mostraron que, en comparación con los controles de tipo silvestre, las retinas de ratones Dll4^{+lacZ} mostraron un aumento del 68% en el número de brotes en el frente de crecimiento de la vasculatura retiniana superficial (Figura 1) así como más de un aumento de factor dos en el número de las interconexiones capilares por área unitaria, dando como resultado un aumento significativo en el recubrimiento vascular. A pesar de los marcados cambios morfológicos, la inyección intravascular
25 de lectina fluorescinada llenó completamente el plexo vascular superficial en desarrollo, excepto los filopodios que se extendían desde las células guía tanto en ratones Dll4^{+lacZ} como en ratones de tipo silvestre, indicando que todos los componentes de la vasculatura en desarrollo tenían lúmenes y eran funcionales.

30 **Ejemplo 2. Efecto de la inhibición de Dll4/Notch con Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 en la vasculatura retiniana en desarrollo.**

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de la inhibición farmacológica de la señalización de Dll/Notch en la proliferación de células endoteliales y la brotación de vasos sanguíneos durante la angiogénesis retiniana en desarrollo normal.

35 Anticuerpos y reactivos. El Dll4-Fc comprende el dominio extracelular de Dll4 de ratón o humano y la parte Fc de IgG humana. El Dll4-Fc se expresó en células CHO y se purificó por afinidad mediante cromatografía de proteína A. El anticuerpo anti-Dll4 se produjo mediante inmunización de conejos con mDll4-hFc recombinante. El antisero se purificó parcialmente mediante cromatografía de proteína A antes del uso.

40 Animales. Se usaron ratones C57/Bl6 (Taconic) para estudiar el efecto de Dll4-Fc o anticuerpo de Dll4 neutralizante sobre la vasculatura retiniana en desarrollo.

45 Microinyecciones intravítreas. Se realizaron microinyecciones intravítreas (30 -100 nl) de los compuestos en investigación entre el ecuador y el limbo corneal usando un nanoinyector Drummond Scientific (BroPA) equipado con una aguja de vidrio.

50 Marcaje con BrdU. Las células en proliferación se marcaron mediante administración de BrdU (1 mg/kg i.p.) 20 h después de la inyección intravítrea de hFc o Dll4-Fc. Se recogieron las retinas 4 horas más tarde y se tiñeron con anti-BrdU (Dako North America, Inc., Carpintería, CA) y anticuerpos de VE-Cadherina (BD PharMingen, San Diego, CA).

55 Resultados. Para estudiar el efecto de la deficiencia intra-retiniana local en la señalización de Dll4/Notch y no secundaria a una anomalía sistémica no detectada se inyectó una versión soluble de Dll4 (denominada Dll4-Fc) que se une a receptores Notch sin activar los mismos, bloqueando de este modo las acciones de Dll4 endógeno, o un anticuerpo policlonal neutralizante específico para el dominio extracelular de Dll4 en el cuerpo vítreo de los ratones de tipo silvestre. Tres días después de la administración intraocular de bloqueante de Dll4 los vasos retinianos mostraron cambios morfológicos que se parecían mucho a las anomalías vasculares encontradas en ratones Dll4^{+lacZ} incluyendo una densidad de vasos sanguíneos y un calibre vascular espectacularmente
60 aumentados. Además, estos cambios morfológicos característicos tuvieron lugar rápidamente, siendo claramente evidentes en el intervalo de 24 horas.

El marcaje con BrdU también mostró un aumento en la proliferación de células endoteliales en el intervalo de 24 h del bloqueo de Dll4 (Figura 2). El aumento del 17% observado en la tasa de proliferación podría producir un aumento de más del 50% en el número de células en el intervalo de tres a cuatro tiempos de duplicación.

Ejemplo 3. Efecto de DII4-Fc y anticuerpo anti-DII4 sobre la vascularización, perfusión y anomalías vasculares retinianas en ratones con OIR.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de DII4-Fc y anticuerpo anti-DII4 sobre el crecimiento de vasos retinianos, formación de anomalías vasculares y perfusión retiniana en retinopatía isquémica inducida por oxígeno (OIR).

Para determinar si la señalización de DII4/Notch desempeña un papel en la angiogénesis patológica así como durante el desarrollo normal se utilizó el modelo de OIR. En el modelo de OIR, la exposición de crías de ratón a hiperoxia en P7 da como resultado una rápida obliteración de los capilares en la retina central. Después de la vuelta al aire ambiental en P12, la zona avascular se convierte en gravemente hipóxica, lo que, a su vez, causa una extensa neovascularización anormal, caracterizada por el crecimiento ectópico de vasos en el cuerpo vítreo ("penachos" vasculares epirretinianos) y la formación de derivaciones arteriovenosas anormales; las partes centrales de la retina permanecen en gran medida avasculares durante un prolongado periodo.

Animales y modelo de OIR. Se usaron ratones C57/Bl6 (Taconic) para estudiar el efecto de DII4-Fc o anticuerpo de DII4 neutralizante sobre la neovascularización retiniana en OIR. Se produjo OIR siguiendo el método desarrollado por Smith *et al.* (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994, 35: 101-111). En resumen, las crías de ratón y sus madres se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% desde los días postnatales (P) 7 a P12 y después se devolvieron al aire ambiental. La exposición a hiperoxia induce la vaso-obliteración rápida en la retina central. Cuando los ratones se devuelven al aire ambiental (P12), la pérdida de vasos de la retina central da como resultado hipoxia/isquemia grave que, a su vez, estimula los cambios vasculares patológicos descritos anteriormente.

Para marcar los vasos sanguíneos permeables se inyectaron 50 µl de lectina de *Lycopersicon esculentum* (LE) marcada con rojo Texas (1 mg/ml; Vector Laboratories, CA) en el ventrículo cardiaco izquierdo y se dejó circular durante 5 min.

Resultados. La inhibición de DII4/Notch con DII4-Fc o anticuerpo anti-DII4 mitigó la neovascularización patológica (Fig. 3A-B), estimuló el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Fig. 4A-B) y mejoró la re-perfusión retiniana (Fig. 5).

El DII4-Fc o anticuerpo anti-DII4 o una proteína de control (hFc) se inyectó por vía intravítrea en P13, un día después de que los animales se hubiesen devuelto al aire ambiental, bastante después de que hubiese finalizado la vaso-obliteración. Cuando las retinas se evaluaron en P17, la administración de DII4-Fc o anticuerpo anti-DII4 suprimió espectacularmente el crecimiento ectópico de penachos neovasculares patológicos en el cuerpo vítreo (Figura 1) y también evitó la formación de derivaciones arteriovenosas anormales. Las áreas ocupadas por penachos neovasculares se redujo el 43% en las retinas tratadas con DII4-Fc y el 85% en las retinas tratadas con anticuerpo anti-DII4, ambas en comparación con retinas de control tratadas con hFc.

Además se observó que el DII4-Fc y anticuerpo anti-DII4 estimulan una brotación más extensa de nuevos vasos a partir de capilares y venas que bordean la zona avascular, dando como resultado una regeneración más rápida de vasos sanguíneos en la retina central donde la vasculatura se había agotado, reduciendo de este modo el área retiniana avascular (Fig. 4A-B). Las áreas avasculares se redujeron el 43% en las retinas tratadas con DII4-Fc y el 63% en las retinas tratadas con anticuerpo anti-DII4. Fue particularmente notable la regeneración capilar extensa que surgía de las venas en la zona avascular de retinas tratadas con DII4-Fc. Por tanto, la atenuación de la señalización de DII4/Notch favoreció la extensión de nuevos brotes vasculares a lo largo de la superficie retiniana y redujo la formación de neovascularización epirretiniana, dando como resultado una reformación más rápida del plexo vascular superficial. Los nuevos vasos en formación eran funcionales y mostraron una reperfusión retiniana mejorada, como fue evidente por la reducción del 45% de las áreas no perfundidas en retinas tratadas con DII4-Fc (Figura 5).

Ejemplo 4. Efecto de DII4-Fc y anticuerpo anti-DII4 sobre la hipoxia/isquemia retiniana en el modelo de OIR.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de DII4-Fc y anticuerpo anti-DII4 sobre la hipoxia/isquemia retiniana en el modelo de OIR de neovascularización patológica.

El crecimiento excesivo de vasos sanguíneos en ciertas circunstancias puede interferir con la circulación normal de la sangre y reducir la oxigenación tisular. Para ensayar si la inhibición de DII4/Notch puede mejorar la oxigenación tisular se usó HYPOXYPROBE™-1 (Chemicon) en un ensayo no invasivo para detectar hipoxia tisular y para determinar el efecto del tratamiento de DII4-Fc sobre la hipoxia/isquemia retiniana. Se inyectó por vía intraperitoneal HYPOXYPROBE™-1 con 100 mg/kg una hora antes de recoger las retinas para la evaluación.

Resultados. El crecimiento de nuevos vasos funcionales después de la administración intravítrea de inhibidores de DII4/Notch redujo efectivamente la hipoxia/isquemia tisular como es evidente por la reducción del 69% y del 30% de las áreas positivas a hydroxyprobe en retinas tratadas con DII4-Fc o anticuerpo anti-DII4, respectivamente (Fig. 6A-B).

Ejemplo 5. La delección genética de un único alelo de Dll4 reduce la vaso-obliteración inducida por hiperoxia.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de la deficiencia genética parcial de Dll4 sobre la regresión de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

Animales. Se generaron ratones $Dll4^{+/lacZ}$ sometidos a retrocruzamiento durante 3 generaciones para ICR (87,5% de ICR) como se ha descrito anteriormente. Debido a una mutación recesiva (rd/rd), la capa celular de fotorreceptores retinianos comienza a degenerarse en P12 en los ratones ICR. Por lo tanto, para obviar los potenciales efectos secundarios de la pérdida de fotorreceptores en la vasculatura retiniana, para evaluar estadios más tardíos del desarrollo retiniano y para todos los experimentos de OIR, los ratones $Dll4^{+/lacZ}$ (87,5% de ICR) se sometieron a retrocruzamiento hasta C57BL/6 para producir ratones Rd/rd que no muestran degeneración de fotorreceptores.

Las crías de ratones se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% desde los días postnatales (P) 7 a P12. Las retinas se recogieron y se analizó la vasculatura retiniana en preparaciones en plano.

Resultados. La expresión reducida de Dll4 en la vasculatura retiniana de ratones $Dll4^{+/lacZ}$ previene parcialmente la pérdida de vasos sanguíneos retinianos inducida por hiperoxia (Figura 7). En el modelo de OIR, la exposición de crías de ratón a hiperoxia en P7 da como resultado una rápida oclusión y obliteración de capilares en la retina central. Para determinar si la inhibición de Dll4/Notch puede tener un efecto protector sobre los vasos sanguíneos se analizó el efecto de la deficiencia genética parcial de Dll4 en ratones $Dll4^{+/lacZ}$ en la vaso-obliteración inducida por hiperoxia. Al evaluar los animales en P12 (a fin de evaluar el alcance de la vaso-obliteración hiperóxica), se halló que la vaso-obliteración estaba reducida el 40% en ratones $Dll4^{+/lacZ}$ en comparación con animales de control de la misma camada de tipo silvestre, sugiriendo que los inhibidores de Dll4 pueden proteger los vasos sanguíneos existentes de regresión.

Ejemplo 6. Efectos de Dll4-Fc y anticuerpo anti-Dll4 sobre la vaso-obliteración inducida por hiperoxia.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de la inhibición de Dll4/Notch con Dll4-Fc y anticuerpo anti-Dll4 sobre la regresión de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

Animales. Se usaron ratones C57/Bl6 (Taconic) para estudiar el efecto de Dll4-Fc o anticuerpo de Dll4 neutralizante sobre la vaso-obliteración retiniana inducida por oxígeno. Se llevaron a cabo microinyecciones intravítreas de los compuestos en investigación el día postnatal 8. El día postnatal 9, las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75%. Se recogieron las retinas 24 horas después y la vasculatura retiniana se analizó en preparaciones en plano.

Resultados. La inyección intravítrea de Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 redujo espectacularmente las áreas de vasculatura con obliteración el 97% y el 41%, respectivamente (Fig. 8A-B).

Ejemplo 7. Efectos de Dll4-Fc y anticuerpo anti-Dll4 sobre la oclusión de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos de la inhibición de Dll4/Notch con Dll4-Fc y anticuerpo anti-Dll4 sobre la oclusión de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia. Todos los procedimientos se realizaron como se ha descrito anteriormente.

El tratamiento con Dll4-Fc y anticuerpo anti-Dll4 redujo las áreas retinianas no perfundidas en el 40% y el 29%, respectivamente (Fig. 9A-B).

Ejemplo 8. Efectos de la administración sistémica de Dll4-Fc sobre la regresión de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

Se llevó a cabo una investigación para determinar los efectos del tratamiento sistémico con Dll4-Fc sobre la regresión de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

Se inyectaron 4,1 μ m de hDll4-hFc o 5 μ m de proteína de control hFc humana por vía intravítrea (ITV) o se inyectó hDll4-hFc por vía intraperitoneal a una dosis de 25 mg por kg del peso corporal en P7. Las crías se pusieron en un entorno de oxígeno al 75% en P8 y se analizó la vasculatura retiniana en P9. Todos los otros procedimientos se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

Resultados. La administración tanto local (intravítrea) como sistémica (intraperitoneal) de Dll4-Fc redujo las áreas de vasculatura con obliteración el 86% y el 56%, respectivamente, indicando que, independientemente de la vía de administración, los inhibidores de Dll4 pueden usarse de forma eficaz para proteger los vasos sanguíneos de regresión (Fig. 10).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc
- 5 <120> Métodos terapéuticos para tratar trastornos vasculares del ojo con antagonistas de DLL4
- <130> 3090A-WO
- <140> A asignar
- 10 <141> 07-08-2007
- <150> 60/836.003
- <151> 07-08-2006
- 15 <160> 5
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 2058
- <212> ADN
- <213> Homo sapien
- <400> 1
- 25

atggcggcag	cgtcccggag	cgectctgge	tgggcgctac	tgctgctggt	ggcactttgg	60
cagcagcgcg	cggccggctc	cggcgtcttc	cagctgcagc	tgcaaggagt	catcaacgag	120
cgcgcgctac	tggccagtgg	gcggccttgc	gagccccggc	gccggacttt	cttccgcgctc	180
tgctttaagc	acttccaggc	ggtcgtctcg	cccggaccct	gcaccttcgg	gaccgtctcc	240
acgcccgtat	tgggcaccaa	ctccttcgct	gtccgggacg	acagtagcgg	cggggggcgc	300
aacctctcc	aactgccctt	caatttcacc	tggccgggta	cctctcgcct	catcatcgaa	360
gcttggcacg	cgccaggaga	cgacctgcgg	ccagaggcct	tgccaccaga	tgactcatc	420
agcaagatcg	ccatccaggg	ctccctagct	gtgggtcaga	actggttatt	ggatgagcaa	480
accagcacc	tcacaaggct	gcgctactct	taccgggtca	tctgcagtga	caactactat	540
ggagacaact	gctcccgcct	gtgcaagaag	cgcaatgacc	acttcggcca	ctatgtgtgc	600
cagccagatg	gcaacttgtc	ctgcctgccc	ggttggactg	gggaatattg	ccaacagcct	660
atctgtcttt	cgggctgtca	tgaacagaat	ggctactgca	gcaagccagc	agagtgcctc	720
tgccgcccag	ctgggcaggg	cggctgtgt	aacgaatgca	tccccacaa	tggctgtcgc	780
caaggcacc	gcagcactcc	ctggcaatgt	acttgtgatg	agggctgggg	aggcctgttt	840
tgtgaccaag	atctcaacta	ctgcacccac	cactccccat	gcaagaatgg	ggcaacgtgc	900
tccaacagtg	ggcagcgaag	ctacacctgc	acctgtcgcc	caggctacac	tgggtggyac	960
tgtgagctgg	agctcagcga	gtgtgacagc	aacctctgtc	gcaatggagg	cagctgtaag	1020
gaccaggagg	atggctacca	ctgcctgtgt	cctccgggct	actatggcct	gcattgtgaa	1080
cacagcacct	tgagctgcgc	cgactcccc	tgettcaatg	ggggctcctg	ccgggagcgc	1140
aaccaggggg	ccaactatgc	ttgtgaatgt	cccccaact	tcaccggctc	caactgcgag	1200
aagaaagtgg	acaggtgcac	cagcaacccc	tgtgccaacg	ggggacagtg	cctgaaccga	1260
ggtccaagcc	gcatgtgccg	ctgccgtcct	ggattcacgg	gcacctactg	tgaactccac	1320
gtcagcgact	gtgcccgtaa	cccttgcgcc	cacgggtgca	cttgccatga	cctggagaat	1380
gggctcatgt	gcacctgccc	tgccggcttc	tctggccgac	gctgtgaggt	gcggacatcc	1440
atcgatgctt	gtgcctcgag	tccttgcctc	aacagggcca	cctgctacac	cgacctctcc	1500
acagacacct	ttgtgtgcaa	ctgcccattt	ggctttgtgg	gcagccgctg	cgagttcccc	1560
gtgggcttgc	cgcccagctt	cccctgggtg	gccgtctcgc	tgggtgtggg	gctggcagtg	1620
ctgctggtac	tgctgggcat	ggtggcagtg	gctgtgcggc	agctgcggct	tcgacggccg	1680
gacgacggca	gcaggggaagc	catgaacaac	ttgtcggact	tccagaagga	caacctgatt	1740
cctgcccgcc	agcttaaaaa	cacaaaccag	aagaaggagc	tggaaagtga	ctgtggcctg	1800
gacaagtcca	actgtggcaa	acagcaaac	cacacattgg	actataatct	ggccccaggg	1860
cccctggggc	gggggaccat	gccaggaaag	ttccccaca	gtgacaagag	cttaggagag	1920
aaggcgccac	tgcgggtaca	cagtgaaaag	ccagagtgtc	ggatatcagc	gatatgctcc	1980
cccagggact	ccatgtacca	gtctgtgtgt	ttgatatcag	aggagaggaa	tgaatgtgtc	2040
attgccacgg	aggtataa					2058
- <210> 2
- <211> 685
- <212> PRT
- <213> Homo sapien
- 30

<400> 2

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
50 55 60
Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
65 70 75 80
Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
85 90 95
Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
100 105 110
Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
115 120 125
Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
130 135 140
Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
145 150 155 160
Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
165 170 175
Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
180 185 190
Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
195 200 205
Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
210 215 220
Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
225 230 235 240
Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
245 250 255
Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
260 265 270
Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
275 280 285
Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
290 295 300
Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
305 310 315 320
Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
325 330 335
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
340 345 350
Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
355 360 365
Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
370 375 380
Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
385 390 395 400
Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
405 410 415
Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
420 425 430

Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 440 445
 Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
 450 455 460
 Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
 465 470 475 480
 Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
 485 490 495
 Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
 500 505 510
 Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 520 525
 Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 535 540
 Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 550 555 560
 Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 570 575
 Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 585 590
 Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 600 605
 Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
 610 615 620
 Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
 625 630 635 640
 Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
 645 650 655
 Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
 660 665 670
 Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 3
 <211> 3427
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

5

<400> 3

ctcgcaggct aggaaccgga ggccaagagc tgcagccaaa gtcacttggg tgcagtgtac 60
 tccctcacta gcccgctcga gaccctagga ttigtctccag gacacgtact tagagcagcc 120
 accgcccagt cggccctacc tggattacct accgaggcat cgagcagcgg agtttttgag 180
 aaggcgacaa gggagcagcg tcccgagggg aatcagcttt tcaggaactc ggctggcaga 240
 cgggacttgc gggagagcga catccctaac aagcagattc ggagtcccgg agtggagagg 300
 acaccccaag ggatgacgcc tgcgtcccgg agcgcctgtc gctgggogct actgctgctg 360
 gcggtactgt ggccgcagca gcgcgctgcg ggctccggca tcttcagct gcggctgcag 420
 gagttegtca accagcgcgg tatgctggcc aatgggcagt cctgcgaacc gggctgccgg 480
 actttcttc gccattgcct taagcacttc caggcaacct tctccgagg accctgcacc 540
 tttggcaatg tctccacgcc ggtattgggc accaactcct tcgtcgtcag ggacaagaat 600
 agcggcagtg gtcgcaacc tctgcagttg cccttcaatt tcacctggcc gggaaccttc 660
 tcaactcaaca tccaagcttg gcacacaccg ggagacgacc tgcggccaga gacttcgcca 720
 ggaaactctc tcatcagcca aatcatcacc caaggctctc ttgctgtggg taagatttgg 780
 cgaacagacg agcaaaatga caccctcacc agactgagct actcttaccg ggctcatctgc 840
 agtgacaact actatggaga gagctgttct cgcctatgca agaagcgcga tgaccacttc 900
 ggacattatg agtggcagcc agatggcagc ctgtcctgcc tgccgggctg gactgggaag 960
 tactgtgacc agcctatatg tctttctggc tgtcatgagc agaatgggta ctgcagcaag 1020
 ccagatgagt gcatctgccg tccagggttg cagggtcggc tgtgcaatga atgtatcccc 1080
 cacaatggct gtcgtcatgg cacctgcagc atcccctggc agtgtgectg cgatgagggg 1140
 tggggaggtc tgtttgtga ccaagatctc aactactgta ctaccactc tccgtgcaag 1200
 aatggatcaa cgtgttccaa cagtgggcca aagggttata cctgcacctg tctcccaggc 1260

10

```

tacactggtg agcactgtga gctgggactc agcaagtgtg ccagcaaccc ctgtcgaat 1320
ggtggcagct gtaaggacca ggagaatagc taccactgcc tgtgtcccc aggetactat 1380
ggccagcact gtgagcatag taccttgacc tgtgcgact caccctgctt caatgggggc 1440
ccttgccggg agcgcaacca ggggtccagt tatgcctgcg aatgcccc caactttacc 1500
ggctctaact gtgagaagaa agtagacagg tgtaccagca acccgtgtgc caatggaggc 1560
cagtgcctga acagaggctc aagccgaacc tgcgctgcc ggctggatt cacaggcacc 1620
cactgtgaac tgcacatcag cgattgtgcc cgaagtccct gtgcccacgg gggcacttgc 1680
cacgatctgg agaatgggcc tgtgtgcc tgccecgctg gcttctctgg caggcgctgc 1740
gaggtgcgga taaccacga tgcctgtgcc tccggaccct gcttcaatgg ggcacctgc 1800
tacactggcc tctccccaaa caactctgtc tgcactgtc cttatggctt tytgggcagc 1860
cgctgcgagt ttcccgtggg ctggccacc agcttcccct gggtagctgt ctcgctgggc 1920
gtggggctag tggtagctgt ggtgctgtg gtcatgggtg tagtggctgt gcggcagctg 1980
cggcttcgga ggcccgatga cgagagcagg gaagccatga acaatctgtc agacttccag 2040
aaggacaacc taatecctgc cgcccagctc aaaaacacaa accagaagaa ggagctggaa 2100
gtggactgtg gtctggacaa gtccaattgt ggcaactgc agaaccacac attggactac 2160
aatctagccc cgggactcct aggacggggc agcatgcctg ggaagtatcc tcacacctgc 2220
aagagcttag gagagaaggt gccacttcgg ttacacagtg agaagccaga gtgtcgaata 2280
tcagccattt gctctcccag ggactctatg taccaatcag tgtgittgat atcagaagag 2340
aggaacgagt gtgtgattgc cacagaggtg taaggcagga gcctactcag acaccagct 2400
ccggcccagc agctgggect tccttctgca ttgtttacat tgcactcctg atgggacatc 2460
ttagtatgac acagtgtctc tctgcccagg agggggaaat ggcatagaact gaacagactg 2520
tgaacccgcc aagagtgcg cgggctctgc acactccag gactctgcct ggcttcagat 2580
gggacggccc gccaaaggaa cagagttag gagttagagg agcatcagtt gagctgat 2640
ctaaggtgcc tctcgaactt ggacttgctc tgccaacagt ggtcatcag gagctcttga 2700
ctgttctcca gagagtgga gtggcctag tgggtcttgg cgetgetgta gctcctgtgg 2760
gcatctgtat ttccaaagtg cetttgccca gactccatcc tcacagctgg gcccaaatga 2820
gaaagcagag aggaggttg caaaggatag gcctcccga ggcagaacag ccttggagtt 2880
tggcattaag caggagctac tetgcaggtg aggaaagccc gaggagggga cacgtgtgac 2940
tctccctccc aaccccagca ggtggggtgc cacctgcagc ctctaggcaa gacttggctc 3000
ttcccctggt cctggtgcct ctgggctcat gtgaacagat gggcttaggg cagcctctg 3060
ttgccagcca ggggtacagg cctcactggg gagctcaggg ccttcatgct aaactccaa 3120
taagggagat ggggggaagg gggctgtggc ctaggccctt cctccctca caccatttt 3180
tgggcccctg agcctgggct ccaccagtgc ccaactgttc cccgagacca accttgaagc 3240
cgattttcaa aatcaataa tatgaggttt tgtttttag tttattttgg aatctagtat 3300
tttgataatt taagaatcag aagcactggc ctttctacat tttataacat tttttgtat 3360
ataactgtga tttataatat gaaacagatg tgtacataaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 3420
aaaaaaa

```

<210> 4
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> Homo sapien
 <400> 4

5

```

Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 1          5          10          15
Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln
 20          25          30
Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly
 35          40          45
Gln Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys
 50          55          60
His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val
 65          70          75          80
Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn
 85          90          95
Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp
 100          105          110
Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp
 115          120          125
Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile

```

10

	130					135						140			
Ile	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Ile	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu
145					150					155					160
Gln	Asn	Asp	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys
				165					170						175
Ser	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg
			180					185					190		
Asp	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser
		195					200					205			
Cys	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Lys	Tyr	Cys	Asp	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu
210						215					220				
Ser	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Asp	Glu	Cys
225				230						235					240
Ile	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro
				245					250					255	
His	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Ile	Pro	Trp	Gln	Cys	Ala
		260						265					270		
Cys	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr
		275					280					285			
Cys	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser
290						295					300				
Gly	Pro	Lys	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Glu
305					310					315					320
His	Cys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Lys	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn
				325					330					335	
Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asn	Ser	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro
			340					345					350		
Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gln	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Thr	Cys	Ala
		355					360					365			
Asp	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly
		370				375					380				
Ser	Ser	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys
385					390					395					400
Glu	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly
				405					410					415	
Gln	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly
			420					425					430		
Phe	Thr	Gly	Thr	His	Cys	Glu	Leu	His	Ile	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Ser
		435					440					445			
Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Pro	Val
450						455					460				
Cys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Ile
465					470					475					480
Thr	His	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Gly	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys
				485					490					495	
Tyr	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	Asn	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly
			500					505					510		
Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe
		515					520						525		
Pro	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Val
530						535							540		
Leu	Leu	Val	Met	Val	Val	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg
545					550					555					560
Pro	Asp	Asp	Glu	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln
				565					570					575	
Lys	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys
		580						585					590		
Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys
		595					600					605			
Leu	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly
		610				615						620			

ES 2 398 253 T3

```

Arg Gly Ser Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
625          630          635          640
Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
          645          650          655
Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu
          660          665          670
Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
          675          680          685

```

<210> 5
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5

5

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1      5      10      15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
          20      25      30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
          35      40      45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
          50      55      60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
          65      70      75      80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
          85      90      95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
          100     105     110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          115     120     125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
          130     135     140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
          145     150     155     160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
          165     170     175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
          180     185     190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
          195     200     205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
          210     215     220
Pro Gly Lys
          225

```

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista de ligando de tipo delta 4 (DII4) en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir la pérdida de vasos sanguíneos o para promover la angiogénesis productiva, o ambos, en un sujeto que tiene una lesión isquémica o insuficiencia vascular, en el que el antagonista de DII4 comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a DII4 y que bloquea la unión de DII4 a un receptor Notch o que comprende el dominio extracelular de DII4, conectado opcionalmente a un componente multimerizante.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de DII4 es policlonal o monoclonal.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está humanizado, es quimérico o es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo completamente humano.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab, o un F(ab')₂.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el componente multimerizante es un dominio Fc.
6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la lesión isquémica o la insuficiencia vascular se selecciona entre retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión de vena o arteria retiniana y retinopatía diabética.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la lesión isquémica o la insuficiencia vascular se selecciona entre isquemia cerebral, isquemia cardiaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis e hipertensión sistémica o pulmonar.
8. Un antagonista de ligando de tipo delta 4 (DII4) para el uso en la prevención o reducción de la pérdida de vasos sanguíneos o la promoción de angiogénesis productiva, o ambas, en un sujeto que tiene una lesión isquémica o insuficiencia vascular, en el que el antagonista de DII4 comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a DII4 y que bloquea la unión de DII4 a un receptor Notch o que comprende el dominio extracelular de DII4, conectado opcionalmente a un componente multimerizante.
9. El antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de DII4 es policlonal o monoclonal.
10. El antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está humanizado, es quimérico o es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo completamente humano.
11. El antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab o un F(ab')₂.
12. El antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el componente multimerizante es un dominio Fc.
13. El antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que la lesión isquémica o la insuficiencia vascular se selecciona entre retinopatía de prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión de vena o arteria retiniana y retinopatía diabética.
14. El antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la lesión isquémica o la insuficiencia vascular se selecciona entre isquemia cerebral, isquemia cardiaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis e hipertensión sistémica o pulmonar.
15. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el antagonista de DII4 para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en el que el sujeto tratado es un ser humano.

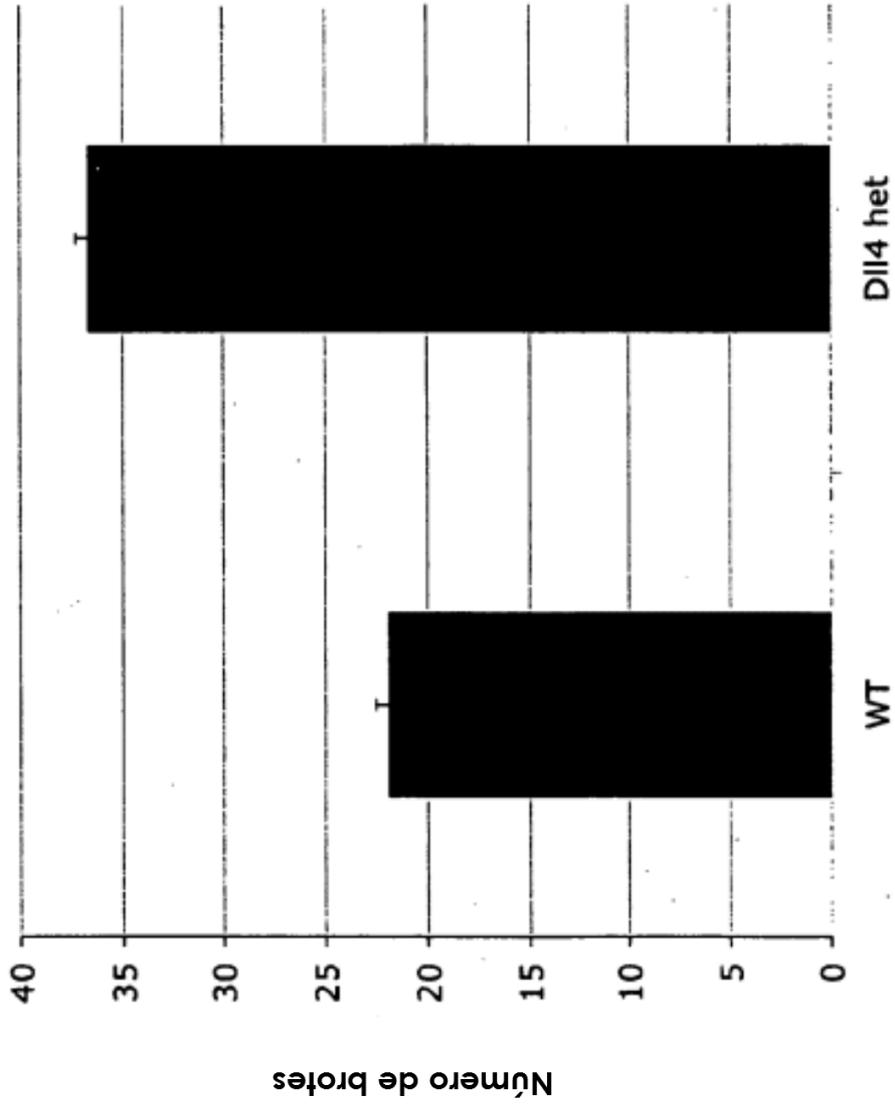


Fig. 1

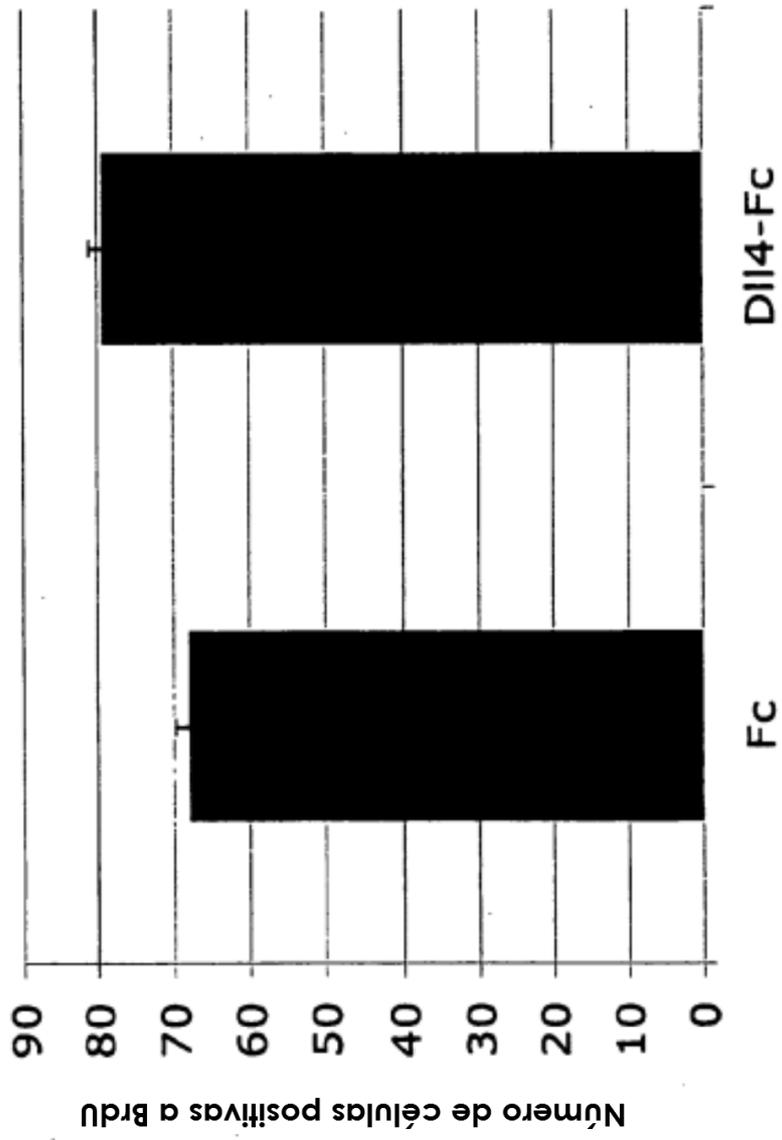


Fig. 2

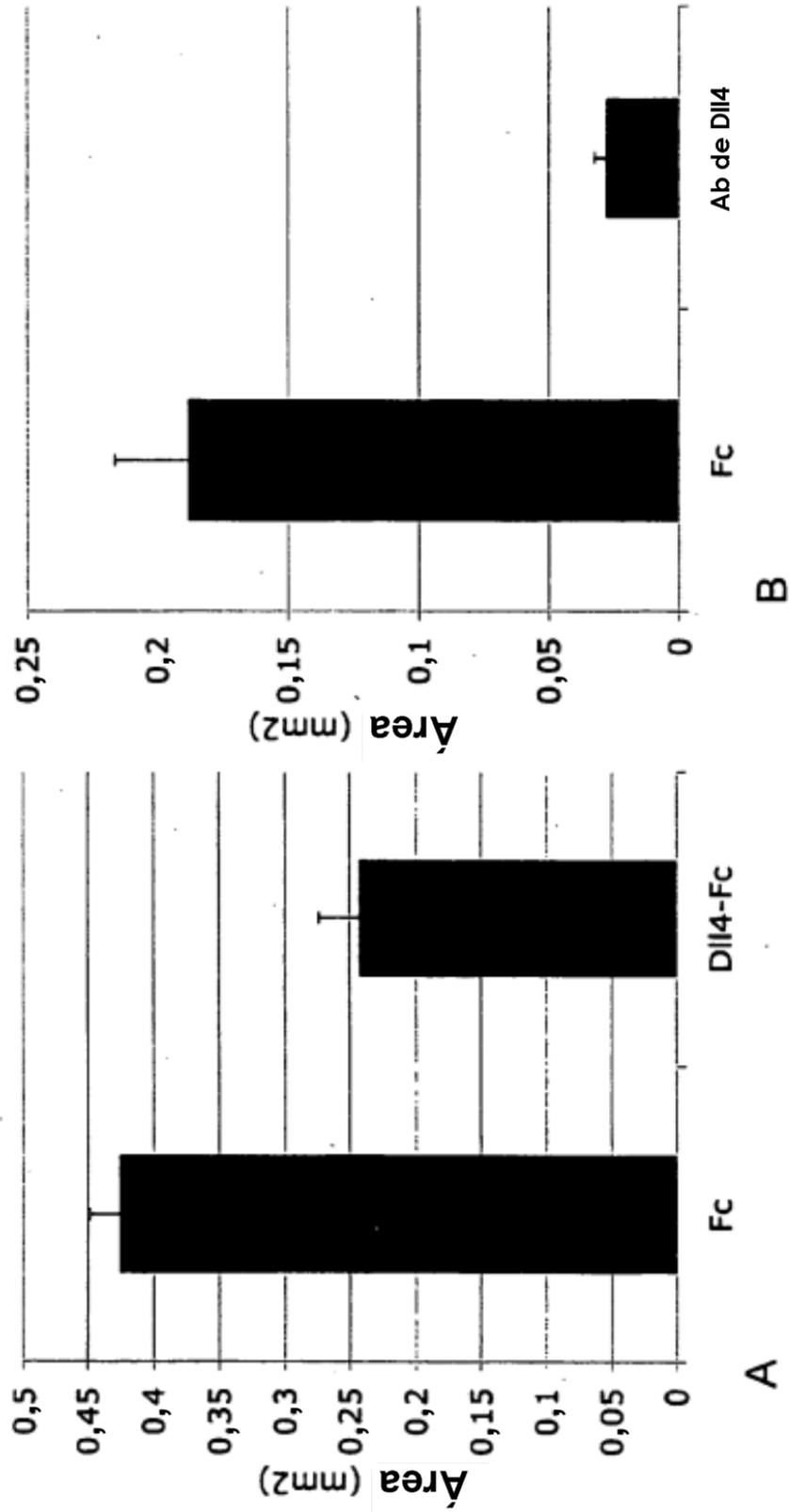


Fig. 3

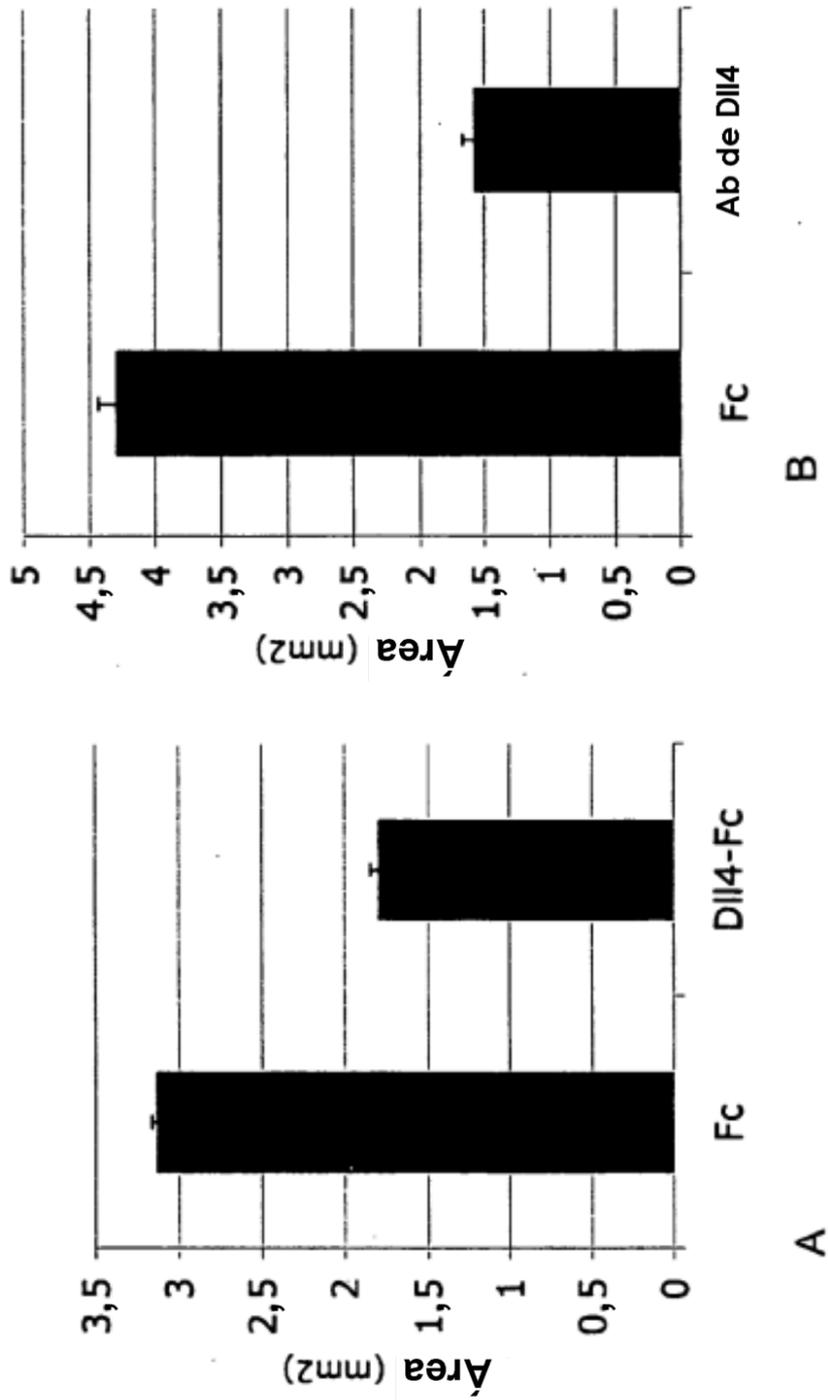


Fig. 4

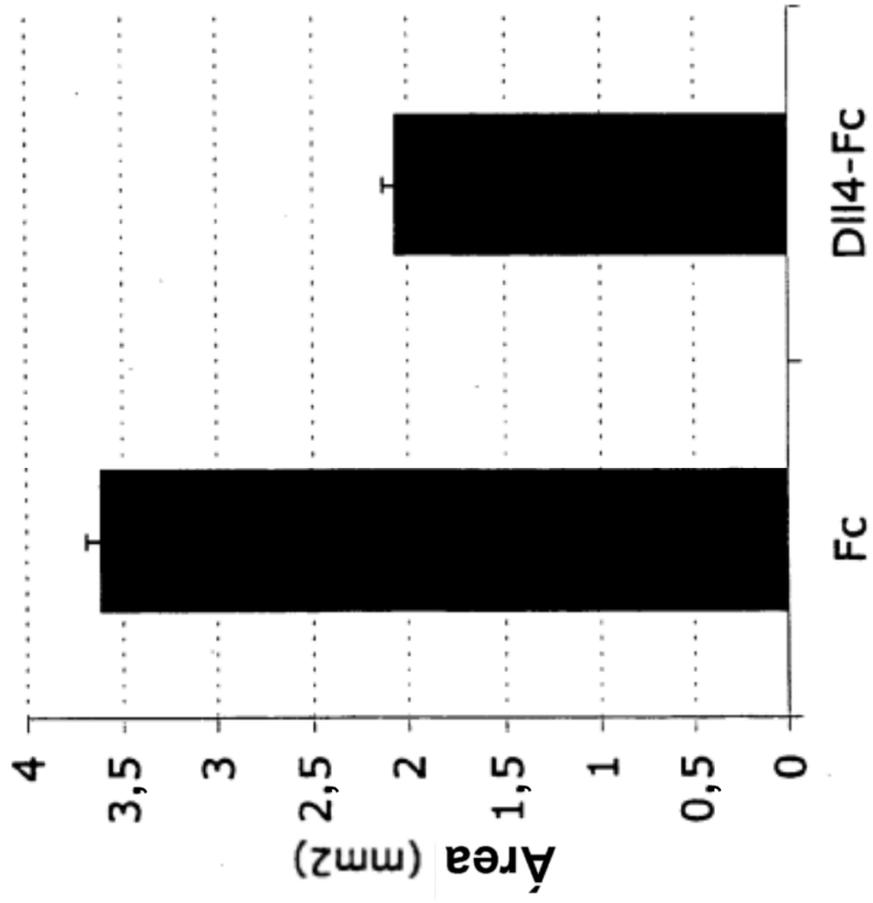


Fig. 5

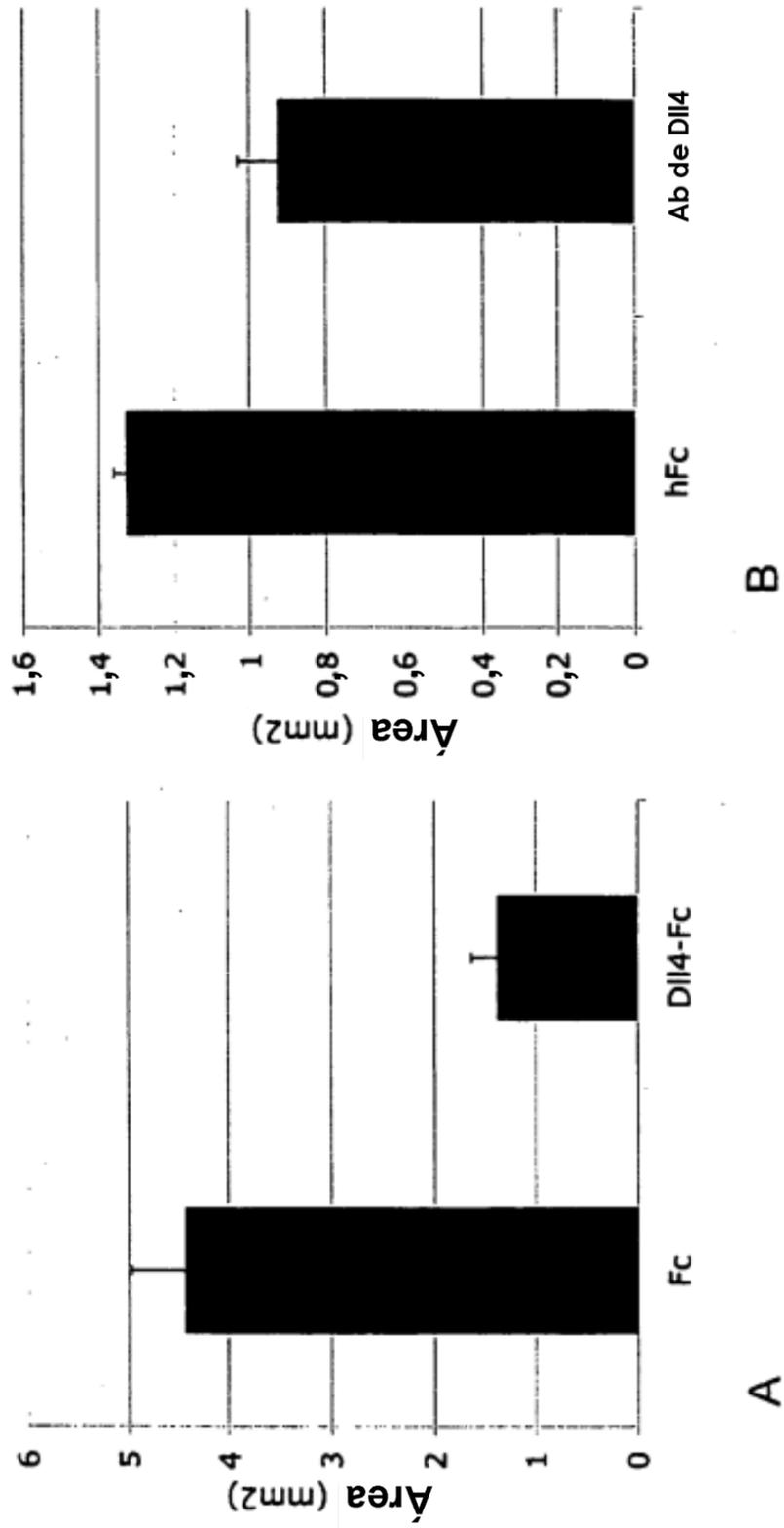


Fig. 6

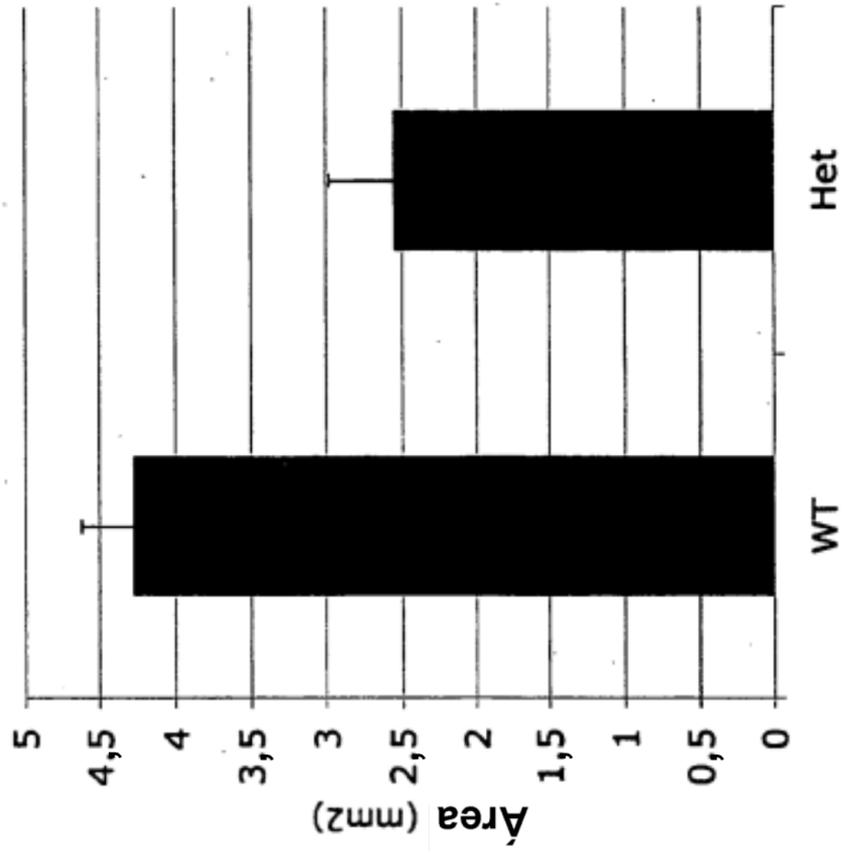


Fig. 7

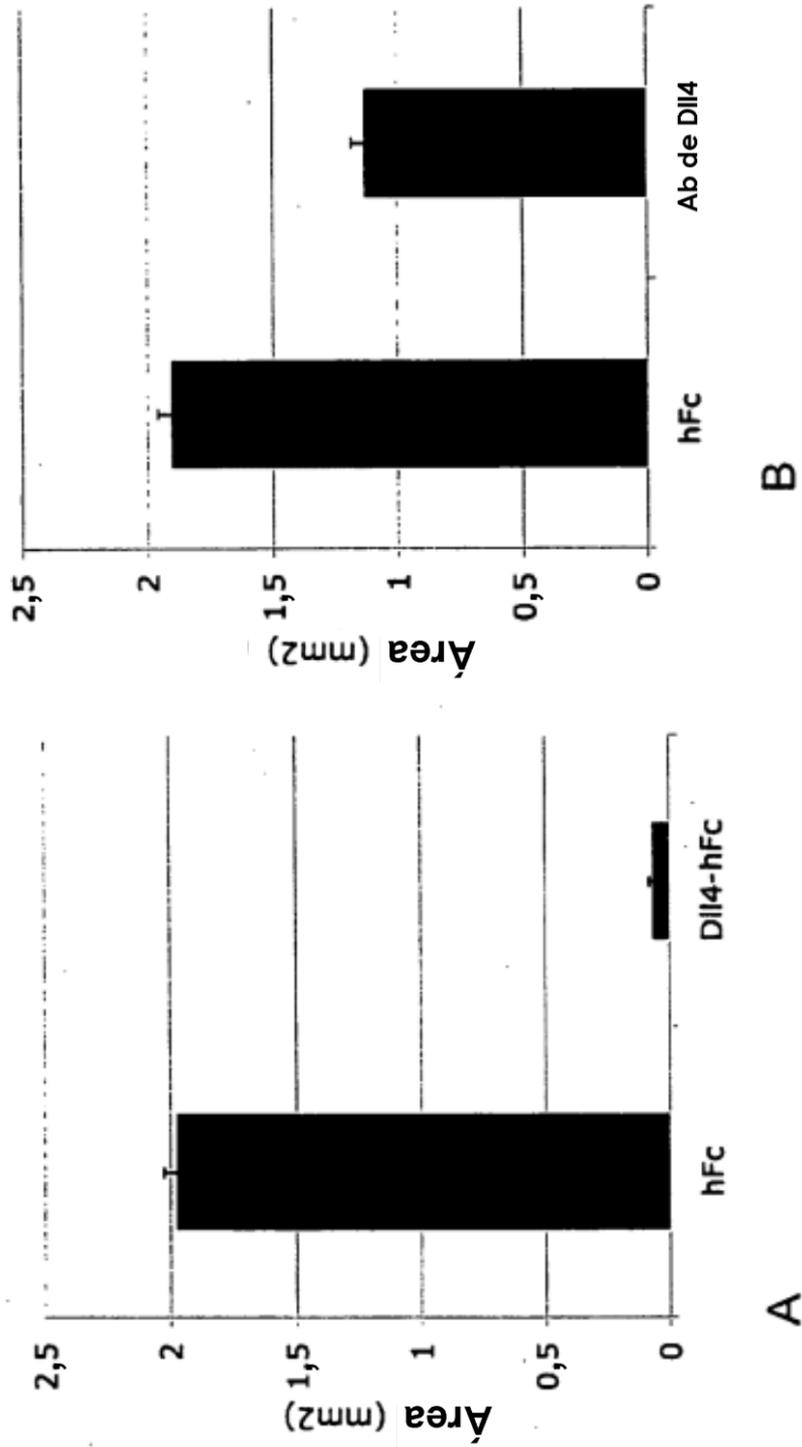


Fig. 8.

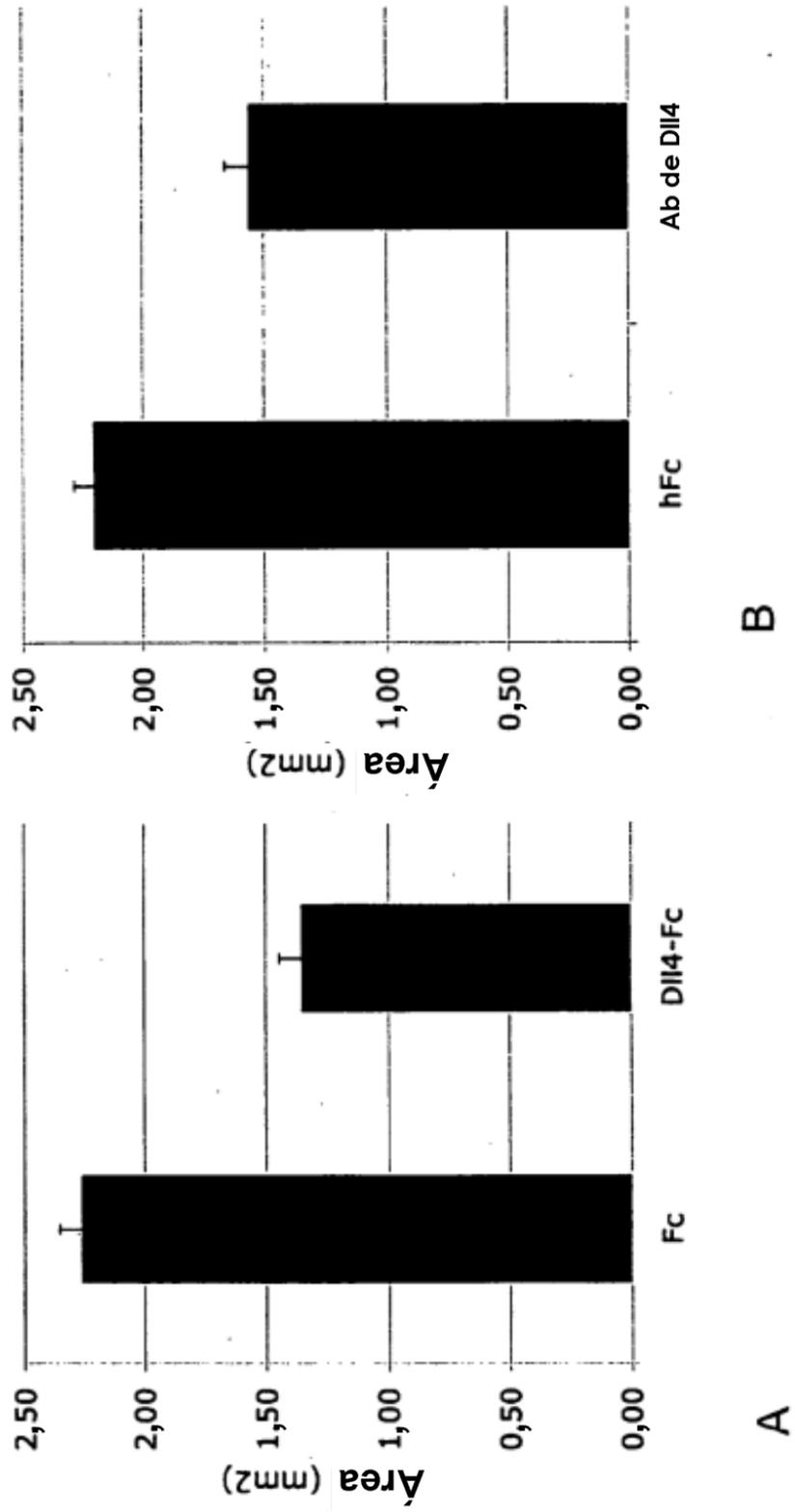


Fig. 9

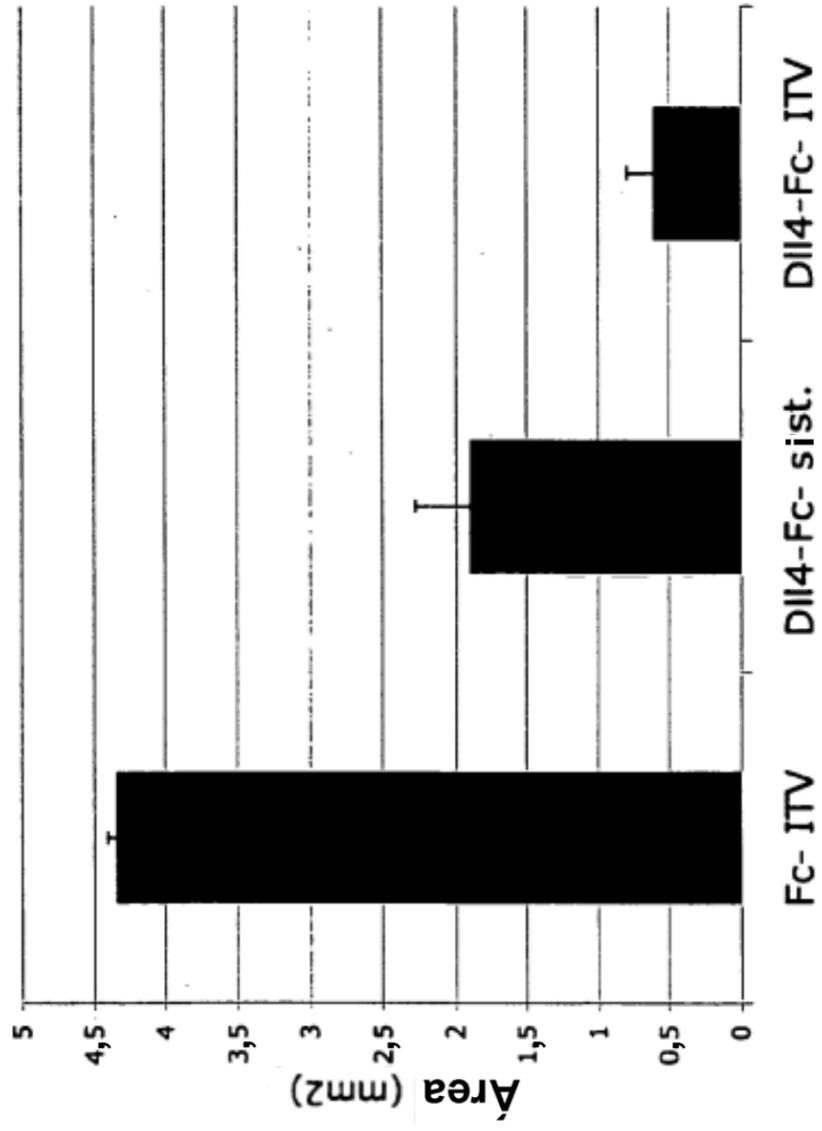


Fig. 10.