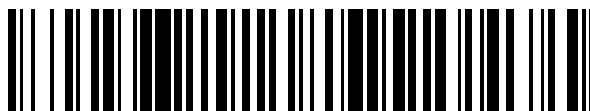


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 040**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2003** **E 03716469 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013** **EP 1572169**

54 Título: **Detección y modulación de la angiogénesis mediada por Slit y Roundabout (Robo), y sus usos**

30 Prioridad:

08.03.2002 US 362485 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2013

73 Titular/es:

**SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL
SCIENCES, CAS (100.0%)
320 YUE YANG ROAD
SHANGHAI 200031, CN**

72 Inventor/es:

GENG, JIAN-GUO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 040 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

Detección y modulación de la angiogénesis mediada por Slit y Roundabout (Robo), y sus usos

Antecedentes de la invención

La angiogénesis es un proceso celular de germinación de capilares y de configuración de neovasculaturas a partir de vasos sanguíneos existentes. Contrasta con otro proceso de formación de vasos sanguíneos denominado vasculogénesis, en el cual los vasos sanguíneos se forman *de novo* por la coalescencia de células progenitoras endoteliales. Durante el desarrollo de los primates, por ejemplo la embriogénesis y la morfogénesis de tejidos/órganos, se producen vasos sanguíneos mediante vasculogénesis y angiogénesis. Sin embargo, en el adulto, los nuevos vasos solo se forman mediante angiogénesis. Excepto durante los ciclos reproductivos femeninos (ovulación, menstruación, implantación y embarazo), las células endoteliales son quiescentes y, así, tienen una vida larga en los mamíferos adultos normales. Sin embargo, sufren un proceso de activación, tras estímulos apropiados, para que se desarrollen en nuevos capilares durante el crecimiento episódico y la remodelación de la red de vasos sanguíneos.

La angiogénesis es de crucial importancia en una diversidad de enfermedades y trastornos fisiológicos y patológicos, que incluyen isquemia e hipoxia, aterosclerosis, reclutamiento y tráfico de leucocitos, hemostasis, curación de heridas, síndrome de filtración vascular, retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular, psoriasis, artritis reumatoide, hemangioma, y metástasis y crecimiento de cánceres (Hanahan, D. y Folkman, J., *Cell*, 86:353-364 (1996); Carmeliet, P. y Jain, R. K., *Nature*, 407:249-257 (2000)). Ahora se reconoce la importancia de la angiogénesis para el crecimiento de una diversidad de cánceres. Por ejemplo, el crecimiento de tumores sólidos requiere la expansión concomitante de redes vasculares para su suministro de sangre; se sabe que un suministro de sangre insuficiente (más de 100 a 200 µm alejados de los vasos sanguíneos) conduce a la necrosis de tejidos cancerosos. Aunque el factor del crecimiento de células endoteliales vascular (VEGF), el factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), las angiopoyetinas y otras moléculas son indispensables para la formación de vasos (Hanahan, D., *Science*, 277:48-50 (1997); Yancopoulos, G. D. *et al.*, *Nature*, 407:242-248 (2000)), aún no se entienden bien los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan la angiogénesis tumoral.

En vertebrados, el sistema vascular actúa principalmente para el transporte de materiales, mientras que el sistema nervioso actúa principalmente para la comunicación de información; de manera notable, ambos tienen las propiedades anatómicas y fisiológicas de los circuitos (Shima, D. T. y Mailhos, C., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10:536-542 (2000)). Por ejemplo, (1) los vasos capilares están formados por células endoteliales recubiertas por pericitos, mientras que los nervios están compuestos por neuronas rodeadas de glia; (2) tanto los vasos sanguíneos como los nervios se ramifican a lo largo de casi todas las partes del cuerpo; y (3) el sistema circulatorio está dividido en arterias (que envían la sangre fuera del corazón) y venas (que envían la sangre de nuevo al corazón), mientras que el sistema nervioso tiene nervios motores (que envían el impulso fuera del cerebro o la médula espinal) y nervios sensoriales (que vuelven a mandar el impulso hacia el cerebro o la médula espinal). Además de compartir estas características morfológicas y funcionales, los vasos sanguíneos y los nervios tienen una relación física íntima, tal como los nervios autónomos que regulan el tono vascular.

En la actualidad se sabe que la exploración de las redes nerviosas requiere de varias familias de pistas migratorias neurológicas, tales como semaforina, efrina, netrina, Slit y varias otras. Sobresaliendo entre estas moléculas que estimulan simultáneamente la angiogénesis está la neuropilina-1, un receptor de membrana de la familia de la semaforina expresado en neuronas en desarrollo y en células endoteliales. Se une a VEGF165, una isoforma de corte y empalme del gen *VEGF* (Soker, S. *et al.*, *Cell*, 92:735-745 (1998)), y desde el punto de vista funcional, sus embriones de ratón mutantes muestran defectos graves en las formaciones vasculares (Kawasaki, T. *et al.*, *Development*, 126:4895-4902 (1999)). Las células tumorales también pueden expresar neuropilina-1, que produce una angiogénesis tumoral sustancialmente potenciada y tumores más grandes. En analogía, los ligandos unidos a las células efrina y su receptor de tirosina quinasas Eph cognado desempeñan papeles fundamentales en el desarrollo vascular. Entre estos, la efrina-B2, un ligando transmembrana expresado específicamente sobre células endoteliales arteriales y las células circundantes, interacciona con múltiples receptores de clase EphB. A la inversa, EphB4, un receptor específico para la efrina-B2, se expresa sobre células endoteliales venosas. Se cree que las señales bidireccionales entre EphB4 y efrina-B2 son específicas para el desarrollo de las arterias y las venas (Wang, H. U. *et al.*, *Cell*, 93:741-753 (1998)). Además, el receptor EphA2 está sobrerregulado en células transformadas y vasculaturas tumorales, en donde es probable que contribuya a la patogénesis del cáncer (Brantley, D. M. *et al.*, *Oncogene*, 21:7011-7026 (2002)). De forma similar, se observa ARNm del receptor Unc5h2 de netrina-1 de rata durante la formación temprana de vasos sanguíneos, lo cual indica la implicación potencial de la netrina y sus receptores en la vasculogénesis (Engelkamp, D., *Mech. Dev.*, 118:191-197 (2002)).

Gordon *et al.* ("Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human Anti-Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Advanced Cancer", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 19:843-850 (2001)) describen la administración de un anticuerpo monoclonal humano recombinante dirigido contra el factor del crecimiento endotelial vascular (VSGF) en pacientes con ciertos cánceres para estudiar la aceptabilidad farmacológica del anticuerpo. Según Gordon *et al.*, la administración del anticuerpo generado por los autores no está asociado con los efectos secundarios relacionados con la infusión, clínicamente significativos, que son comunes a otros anticuerpos.

Slt2, un miembro de otra familia de pistas migratorias "neurológicas", es expresado por células de la línea media y células endoteliales. Reacciona con una proteína transmembrana de la superficie celular, Roundabout1 (Robo 1), y actúa como repelente en la orientación de axones (Kidd, T. *et al.*, *Cell*, 92:201-215 (1998); Brose, K. *et al.*, *Cell*, 96:795-806 (1999); Li, H. S. *et al.*, *Cell*, 96:807-818 (1999)) y la ramificación de axones (Wang, K.-H. *et al.*, *Cell*, 96:771-784 (1999); Whitford, K. L. *et al.*, *Neuron*, 33:47-61 (2002)), la migración neuronal (Wu, W. *et al.*, *Nature*, 400:331-336 (1999)), y como inhibidor endógeno para la quimiotaxis de leucocitos (Wu, J. Y. *et al.*, *Nature*, 410:948-952 (2001)). En la actualidad, existen tres genes *slit*, *slit1*, 2 y 3, y cuatro genes *robo*, *robo1*, *robo2*, *rig-1* y *robo4*, conocidos en mamíferos. Se ha descubierto su expresión fuera del sistema nervioso en roedores (Holmes, G. P. *et al.*, *Mech. Dev.*, 79:57-72 (1998); Piper, M. *et al.*, *Mech. Dev.*, 94: 213-217 (2000)). Por ejemplo, se encuentran ARNm para Slit2 y Slit3, pero no para Slit1, en células endoteliales de rata, y se encuentra ARN de Robo1 en leucocitos de ratón (Wu, J. Y. *et al.*, *Nature*, 410:948-952 (2001)). Además, las células endoteliales humanas expresan Robo4 (Huminiecki, L. *et al.*, *Genomics*, 79:547-552 (2002)). Sin embargo, no se ha determinado si las células de cáncer humano pueden expresar estos genes, en especial a nivel de proteínas.

Breve resumen de la invención

La presente invención está dirigida a composiciones farmacéuticas y a usos de compuestos para la preparación de medicamentos para inhibir la angiogénesis tumoral mediada por Slit2 en un sujeto.

En un aspecto, la presente invención se dirige a los usos de compuestos para la preparación de medicamentos para inhibir la angiogénesis tumoral mediada por Slit2 en un sujeto, según se define en la reivindicación 1. Las realizaciones de los usos son definidas por las reivindicaciones 2-10.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas para inhibir la angiogénesis asociada a tumores mediada por Slit2 en un sujeto, según se define en la reivindicación 11. Las realizaciones de las composiciones son definidas por las reivindicaciones 12 y 13.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La figura 1 muestra las expresiones de Slit2 en células A375 y de Robo1 en células endoteliales. **a** y **e**, se determinó el ARNm de Slit2 en células A375 y el ARNm de Robo1 en HUVEC mediante análisis de RT-PCR semicuantitativa. Las flechas indican las bandas positivas a Slit2 y Robo1. Se ensayó ARNm de β -actina humana como control para la RT-PCR. P-C (PCR control) es una PCR sin moldes; RT-C (RT control) es una PCR que emplee el molde generado sin la transcriptasa inversa. **b** y **f**, transferencia Northern de Slit2 (aproximadamente 5,0 kb) en células A375 y de Robo1 (aproximadamente 4,6 kb) en HUVEC. Se empleó G3PDH (un gen constitutivo) como control. **c** y **g**, se detectó la expresión de proteínas de Slit2 en células A375 (aproximadamente 210 kDa) y de Robo1 (aproximadamente 210 kDa) en HUVEC mediante Ab anti-Slit2 y Robo1, pero no con IgG preinmunológica. Se emplearon células 293/Slit2 y células 293/Robo1 como control positivo, mientras que se utilizaron células 293/V como control negativo. **d**, la Slit2 purificada por afinidad se tiñó con plata o se sometió a una inmunotransferencia con un mAb anti-myc, 9E10. **h** e **i**, tinción inmunohistoquímica de tumores sólidos con el Ab anti-Slit2 (una flecha indica la expresión de Slit2 sobre células A372), el Ab anti-Robo1 (una cabeza de flecha indica la expresión de Robo1 sobre células endoteliales dentro del tumor) e IgG preinmunológica. Barra de escala, 100 μ para **h** y 20 μ m para **i**. Los resultados son representativos de dos de diez experimentos separados.

La figura 2 muestra las formaciones de tubos y las migraciones inducidas por Slit2. Las migraciones de HUVEC (**a** y **b**), células 293/Robo1 y células 293 (**c**) se midieron utilizando el ensayo de la cámara de Boyden. Los resultados se calcularon como los valores de la media $\pm$ D.E. de mediciones por triplicado de tres a seis experimentos separados. Para las mediciones de las migraciones direccionales de HUVEC se aplicó un gradiente de proteínas desde una micropipeta mediante la aplicación pulsátil de Slit2 0,15 μ M o bFGF 1 μ M. Se registraron las micrografías de contraste de fase de células endoteliales individuales en los momentos del tiempo indicados después de la exposición al gradiente de Slit2 o bFGF. La cabeza de flecha indica las direcciones en las que las proteínas se cargaron a través de las pipetas. Barra de escala, 8 μ m. Se presentan las direcciones migratorias inducidas por Slit2 y bFGF (**e**) y las distancias migradas (**f**) (cada punto representa la dirección migratoria y la distancia de una única célula endotelial). **g**, se visualizó la formación de tubos de HUVEC sobre Matrigel mediante microscopía de contraste de fase. Barra de escala, 60 μ m. **h** e **i**, efectos de Slit2 y bFGF sobre la formación de tubos de HUVEC con o sin RoboN o R5. Los resultados se calcularon como los valores de la media $\pm$ D.E. de triplicados de tres a veinte experimentos separados. *, $p < 0,05$ y **, $p < 0,01$ cuando se compara con el control de PBS.

La figura 3 muestra la inhibición de la angiogénesis tumoral y el crecimiento de un melanoma maligno. **a**, detección de RoboN, Slit2 y tubulina en células A375 después de la transfección con un vector insertado con RoboN (A375/RoboN), pero no con el vector sencillo (A375/V), por sus Ab específicos. No hay señales positivas para IgG de conejo preinmunológica (los datos no se muestran). **g**, unión del mAb R5 a células 293/Robo1 pero no a células 293/V. Se empleó el Ab policlonal antihemoaglutinina (Invitrogen) como control positivo. **b** y **h**, mediciones de las velocidades de crecimiento para células A375/V y A375_C1, C2 y C3/RoboN (**b**) y para las células A375 en presencia de R5 o IgG_{2b} de ratón (**h**). Los resultados son los valores de la media $\pm$ D.E. de mediciones por triplicado de tres experimentos separados. **c** e **i**, tinción inmunohistoquímica de vasos sanguíneos dentro de los tumores

sólidos de células A375/V y células A375_C2/RoboN (c) y de células A375 tratadas con IgG_{2b} de ratón y R5 (i) utilizando un Ab anti-CD31 (PharMingen). No se detectó tinción positiva cuando se emplea IgG preinmunológica (los datos no se muestran). Barra de escala, 20 µm. d y j, el análisis estadístico de la tinción de CD31 se realizó utilizando el programa informático ImageTool. Valores de la media ± D.E. de las densidades de los vasos para los tumores sólidos de células A375/V y células A375_C1, C2 y C3/RoboN (d) y células A375 tratadas con IgG_{2b} de ratón y R5 (j; n = 14 para cada grupo). e y k, valores de la media ± D.E. de los pesos tumorales para los tumores sólidos de células A375/V y células A375_C1, C2 y C3/RoboN (e) y células A375 tratadas con IgG_{2b} de ratón y R5 (k; n = 14 para cada grupo). f y l, recuentos de leucocitos en sangre y en tumores para células A375/V y células A375_C1, C2 y C3/RoboN (f) y células A375 tratadas con IgG_{2b} de ratón y R5 (l; n = 14 para cada grupo). *, p<0,05 y **, p<0,01.

La figura 4 muestra la expresión de Slit2 en cánceres. a, inmunotransferencia de lisados celulares procedentes de diversas líneas de células cancerosas con el Ab anti-Slit2. Se emplearon células 293/Slit2 como control positivo, mientras que se emplearon células 293/V como control negativo. b, tinción inmunohistoquímica de cánceres humanos con el Ab anti-Slit2. Las flechas indican la expresión de Slit2 sobre células tumorales. Barra de escala, 100 µm para el panel superior, y 10 µm para el panel inferior, respectivamente. c, gradientes de Slit2 sobre un carcinoma invasivo de mama humano visualizados mediante tinción con el Ab anti-Slit2. Las flechas indican los microvasos dentro de los tumores. Barras de escala, 100 µm para el panel superior, y 40 µm para el panel inferior, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Si una definición indicada en esta sección es contraria o incoherente de cualquier manera con una definición indicada en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se incorporan en la presente como referencia, la definición indicada en esta sección prevalece sobre la definición que se incorpora en la presente como referencia.

Tal como se emplea en la presente, "un/una" significa "al menos un/una" o "un/una o más".

Tal como se emplea en la presente, una "composición" se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos. Puede ser una disolución, una suspensión, un líquido, un polvo, una pasta, ser acuosa, no acuosa o cualquiera de sus combinaciones.

Tal como se emplea en la presente, una "combinación" se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos.

Tal como se emplea en la presente, se pretende que la angiogénesis incluya, de modo amplio, la totalidad de los procesos directa o indirectamente implicados en el establecimiento y el mantenimiento de nueva vasculatura (neovascularización) que incluye, pero no se limita a la neovascularización asociada con tumores.

Tal como se emplea en la presente, un agente o un tratamiento antiangiogénico se refiere a cualquier compuesto y régimen terapéutico que, cuando se emplea por si solo o en combinación con otros compuestos o tratamientos, puede aliviar, reducir, mejorar, prevenir, o colocar o mantener en un estado de remisión a los síntomas clínicos o los marcadores de diagnóstico asociados con una angiogénesis no deseada y/o incontrolada. Así, para los objetivos de la presente, un agente antiangiogénico se refiere a un agente que inhibe el establecimiento o el mantenimiento de la vasculatura. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a agentes antitumorales, y agentes para el tratamiento de otros trastornos asociados con la angiogénesis no deseada, tales como retinopatías diabéticas, reestenosis, trastornos hiperproliferativos y otros.

Tal como se emplea en la presente, los agentes proangiogénicos son agentes que estimulan el establecimiento o el mantenimiento de la vasculatura. Estos agentes incluyen agentes para tratar trastornos cardiovasculares, que incluyen ataques cardíacos e ictus.

Tal como se emplea en la presente, la angiogénesis no deseada y/o incontrolada se refiere a una angiogénesis patológica en la que la influencia de estimuladores de la angiogénesis tiene más peso que la influencia de los inhibidores de la angiogénesis.

Tal como se emplea en la presente, una angiogénesis deficiente se refiere a una angiogénesis patológica asociada con trastornos en los que existe un defecto en la angiogénesis normal que produce una angiogénesis aberrante o una ausencia o una reducción sustancial en la angiogénesis.

Tal como se emplea en la presente, "Slit2" se refiere a un miembro de la familia Slit de pistas migratorias "neurológicas". Es expresado por células de la línea media y células endoteliales, y actúa como repelente en la orientación de axones (Kidd, T. *et al.*, *Cell*, 92:201-215 (1998); Brose, K. *et al.*, *Cell*, 96:795-806 (1999); Li, H. S. *et al.*, *Cell*, 96:807-818 (1999)) y la ramificación de axones (Wang, K.-H. *et al.*, *Cell*, 96:771-784 (1999); Whitford, K. L.

et al., *Neuron*, 33:47-61 (2002)), la migración neuronal (Wu, W. *et al.*, *Nature*, 400:331-336 (1999)), y como inhibidor endógeno para la quimiotaxis de leucocitos (Wu, J. Y. *et al.*, *Nature*, 410:948-952 (2001)). En la actualidad, existen tres genes *slit*, *slit1*, 2 y 3, conocidos en mamíferos. Se ha descubierto su expresión fuera del sistema nervioso en roedores (Holmes, G. P. *et al.*, *Mech. Dev.*, 79:57-72 (1998); Piper, M. *et al.*, *Mech. Dev.*, 94: 213-217 (2000)). Por ejemplo, se encuentran ARNm para *Slit2* y *Slit3*, pero no para *Slit1*, en células endoteliales de rata (Wu, J. Y. *et al.*, *Nature*, 410:948-952 (2001)).

Tal como se emplea en la presente, "Robo1" se refiere a un miembro de la familia Robo de pistas migratorias "neurológicas". Es una proteína transmembrana de la superficie celular expresada por neuronas. Reacciona con *Slit2* y actúa como repelente en la orientación de axones (Kidd, T. *et al.*, *Cell*, 92:201-215 (1998); Brose, K. *et al.*, *Cell*, 96:795-806 (1999); Li, H. S. *et al.*, *Cell*, 96:807-818 (1999)) y la ramificación de axones (Wang, K.-H. *et al.*, *Cell*, 96:771-784 (1999); Whitford, K. L. *et al.*, *Neuron*, 33:47-61 (2002)), la migración neuronal (Wu, W. *et al.*, *Nature*, 400:331-336 (1999)), y como inhibidor endógeno para la quimiotaxis de leucocitos (Wu, J. Y. *et al.*, *Nature*, 410:948-952 (2001)). En la actualidad, existen cuatro genes *robo*, *robo1*, *robo2*, *rig-1* y *robo4*, conocidos en mamíferos. Se ha descubierto su expresión fuera del sistema nervioso en roedores (Holmes, G. P. *et al.*, *Mech. Dev.*, 79:57-72 (1998); Piper, M. *et al.*, *Mech. Dev.*, 94: 213-217 (2000)). Por ejemplo, se encuentra ARN de Robo1 en leucocitos de ratón (Wu, J. Y. *et al.*, *Nature*, 410:948-952 (2001)). Además, las células endoteliales humanas expresan Robo4 (Huminiński, L. *et al.*, *Genomics*, 79:547-552 (2002)).

Tal como se emplea en la presente, las expresiones "sales farmacéuticamente aceptables" o "derivados farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de la presente invención incluyen cualquier sal, éster o derivado que pueda ser preparado con facilidad por los expertos en la técnica. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen, por ejemplo, las derivadas de bases y ácidos bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen, pero no se limitan a sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio), metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amonio y $N(\text{alquilo } C_{1-4})_4^+$. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, toluen-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metansulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalen-2-sulfónico y bencensulfónico. Otros ácidos, tales como el ácido oxálico, que en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse para la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Tal como se emplea en la presente, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o las respuestas fisiológicas que se producen tras la administración *in vivo* de un compuesto, una composición u otra mezcla. Así, la actividad biológica incluye los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o utilizar dichas actividades.

Tal como se emplea en la presente, un "fluido" se refiere a cualquier composición que puede fluir. Así, los fluidos incluyen composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, disoluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones de este tipo.

Tal como se emplea en la presente, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos están de acuerdo con su utilización habitual, sus abreviaturas reconocidas, o the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, a menos que se indique lo contrario (véase, *Biochemistry*, 11:1726 (1972)).

Tal como se emplea en la presente, una "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo, que puede caracterizarse mediante síntomas identificables.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier fármaco o terapia con fármacos convencional que son conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a vacunas.

Tal como se emplea en la presente, una "vacuna" se refiere a cualquier composición prevista para la profilaxis inmunológica activa. Una vacuna puede utilizarse de modo terapéutico para tratar una enfermedad, para prevenir el desarrollo de una enfermedad, o para disminuir la gravedad de una enfermedad de modo proactivo o después de una infección. Los ejemplos de vacunas incluyen, pero no se limita a preparaciones de microbios muertos de cepas virulentas, microbios vivos de cepas atenuadas (variantes o mutantes), o derivados o productos bacterianos, fúngicos, vegetales, protozoarios o metazoarios. El término también incluyen vacunas basadas en proteínas/péptidos y nucleótidos.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Esta cantidad puede administrarse como una dosificación unitaria o según un régimen. Pueden ser necesarias administraciones repetidas para lograr la mejora deseada de los síntomas.

Tal como se emplea en la presente, los términos "administración" o "administrar" un compuesto se refieren a cualquier método adecuado para proporcionar un compuesto de la invención o un profármaco de un compuesto de

la invención a un sujeto.

Tal como se emplea en la presente, el término "tratamiento" se refiere a cualquier manera en que los síntomas de un trastorno, afección o enfermedad se mejoran o se alteran beneficiosamente de otro modo. El tratamiento también incluye cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente. La mejora de los síntomas de un trastorno concreto se refiere a cualquier disminución de los síntomas, tanto permanente como temporal, que pueda atribuirse o asociarse con la administración de la composición.

Tal como se emplea en la presente, un tratamiento antineoplásico se refiere a cualquier tratamiento diseñado para tratar un neoplasma, un tumor o un cáncer mediante la disminución o la mejora de sus síntomas. También se contemplan los tratamientos que previenen la aparición o disminuyen la gravedad de un neoplasma, un tumor o un cáncer.

Tal como se emplea en la presente, un neoplasma (neoplasia) se refiere a un crecimiento nuevo anómalo, y así significa lo mismo que un tumor, que puede ser benigno o maligno. A diferencia de la hiperplasia, la proliferación neoplásica persiste incluso en ausencia del estímulo original.

Tal como se emplea en la presente, un agente antineoplasma (que se emplea de modo intercambiable con agente antineoplásico, agente antitumoral o agente anticanceroso) se refiere a cualquier agente utilizado en el tratamiento antineoplasma. Estos incluyen cualquier agente, que cuando se utiliza por sí solo o en combinación con otros compuestos, puede aliviar, reducir, mejorar, prevenir, colocar o mantener en un estado de remisión a los síntomas clínicos o los marcadores de diagnóstico asociados con un neoplasma, un tumor o un cáncer. El agente antineoplasma que puede utilizarse en las combinaciones de la presente invención incluye, pero no se limita a agentes antiangiogénicos, agentes alquilantes, antimetabolitos, ciertos productos naturales, complejos de coordinación de platino, antracendionas, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, supresores adrenocorticales, ciertas hormonas y antagonistas, polisacáridos anticáncer, y ciertos extractos de hierbas, tales como extractos de hierbas chinas.

Tal como se emplea en la presente, un "gen supresor de tumor" (también denominado antioncogén o gen de susceptibilidad del cáncer) se refiere a un gen que codifica un producto que normalmente regula negativamente el ciclo celular, y que debe ser mutado o inactivado de otra forma antes de que una célula pueda avanzar hacia una división rápida. Los ejemplos de genes supresores de tumores incluyen, pero no se limitan a *p16*, *p21*, *p53*, *RB* (retinoblastoma), *WT-1* (tumor de Wilm), *DCC* (deleciónado en el carcinoma colónico), *NF-1* (neurofibrosarcoma) y *APC* (poliposis coli adenomatosa).

Tal como se emplea en la presente, un "oncogén" se refiere a una versión mutada y/o sobreexpresada de un gen normal de células animales (el *proto-oncogén*) que, de una forma dominante, puede liberar a la célula de los controles normales sobre el crecimiento. Así, un oncogén solo, o en concierto con otros cambios, convierte una célula en una célula tumoral. Los ejemplos de oncogenes incluyen, pero no se limitan a *abl*, *erbA*, *erbB*, *ets*, *fes* (*fps*), *fgr*, *fms*, *fos*, *hst*, *int1*, *int2*, *jun*, *hit*, *B-lym*, *mas*, *met*, *mil* (*raf*), *mos*, *myb*, *myc*, *N-myc*, *neu* (*ErbB2*), *ral* (*mil*), *Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*, *rel*, *ros*, *sis*, *src*, *ski*, *trk* y *yes*.

Tal como se emplea en la presente, los "polinucleótidos antisentido" se refieren a secuencias sintéticas de bases nucleotídicas complementarias con ARNm o la hebra sentido de un ADN bicatenario. La mezcla de polinucleótidos sentido y antisentido bajo condiciones apropiadas conduce a la unión de las dos moléculas o hibridación. Cuando estos polinucleótidos se unen (se hibridan) con ARNm se produce la inhibición de la síntesis de proteínas (traducción). Cuando estos polinucleótidos se unen a ADN bicatenario se produce la inhibición de la síntesis de ARN (transcripción). La inhibición resultante de la traducción y/o la transcripción conduce a la inhibición de la síntesis de la proteína codificada por la hebra sentido.

Tal como se emplea en la presente, un "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos FAb, que están compuestos de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

Tal como se emplea en la presente, los "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que son modificados para incluir secuencias de aminoácidos "humanas", de modo que la administración a un ser humano no provoque una respuesta inmunológica. Los métodos para preparar dichos anticuerpos son conocidos. Por ejemplo, un hibridoma que exprese el anticuerpo monoclonal se altera mediante técnicas de ADN recombinante para que exprese un anticuerpo en el que la composición de aminoácidos de las regiones no variables está basada en anticuerpo humanos. Se han diseñado programas informáticos para identificar dichas regiones.

Tal como se emplea en la presente, un "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que tenga una longitud menor que la longitud completa, conservando al menos una porción de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F(ab)2, Fv monocatenarios (scFv), Fv, dsFv, diacuerpos y Fd. El fragmento puede incluir múltiples cadena unidas entre sí, tal como mediante puentes disulfuro. Un fragmento de anticuerpo generalmente contiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos, y típicamente al menos 200 aminoácidos.

Tal como se emplea en la presente, la "mejora de los síntomas de un trastorno concreto mediante la administración

de una composición farmacéutica concreta" se refiere a cualquier disminución, permanente o temporal, duradera o transitoria que puede atribuirse o asociarse a la administración de la composición.

Tal como se emplea en la presente, "evaluar" pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa, en el sentido de obtener un valor absoluto para el nivel de Slit2 y/o de ligando de Slit2 presente en la muestra, y también obtener un índice, proporción, porcentaje, indicador visual u otro valor indicativo del nivel de actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y, por supuesto, no es necesario que las especies químicas detectadas sean realmente el propio producto de la proteólisis, sino que pueden ser, por ejemplo, uno de sus derivados o alguna otra sustancia.

Tal como se emplea en la presente, "un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector, quimioterapéutico" significa fármacos y terapias con fármacos convencionales, que incluyen vacunas, que son conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes radioterapéuticos son muy conocidos en la técnica.

Tal como se emplea en la presente, un "tratamiento" significa cualquier manera en que los síntomas de un trastorno, una afección o una enfermedad se mejoran o se alteran de otra forma de modo beneficioso. El tratamiento también incluye cualquier uso farmacéutico de las composición de la presente.

B. Métodos para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2

En un aspecto, la presente descripción se dirige a un método para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en un sujeto, comprendiendo dicho método reducir o potenciar la interacción de Slit2-ligando de Slit2 en un sujeto hasta un nivel suficiente para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en dicho sujeto.

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 de nivel anormalmente alto o bajo. En un ejemplo, la enfermedad o el trastorno está asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 de nivel anormalmente alto, y la interacción de Slit2-receptor de Slit2 se reduce para prevenir o tratar la enfermedad o el trastorno. En otro ejemplo, la enfermedad o el trastorno está asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 de nivel anormalmente bajo, y la interacción de Slit2-receptor de Slit2 se potencia para prevenir o tratar la enfermedad o el trastorno.

La interacción de Slit2-receptor de Slit2 puede ser reducida o potenciada por cualquier método adecuado. Por ejemplo, la interacción de Slit2-receptor de Slit2 puede reducirse o potenciarse mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una sustancia que reduzca o potencie la replicación del gen Slit2, la replicación del gen del ligando de Slit2, la transcripción del gen Slit2, la transcripción del gen del ligando de Slit2, el corte y empalme o la traducción del ARNm de Slit2, el corte y empalme o la traducción del ARNm del ligando de Slit2, la maduración o el tráfico celular de un precursor de Slit2, o la maduración o el tráfico celular de un precursor del ligando de Slit2.

En otro ejemplo, la interacción de Slit2-receptor de Slit2 puede reducirse o potenciarse mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una sustancia que reduzca o potencie la interacción proteína-proteína de Slit2-receptor de Slit2. Puede utilizarse cualquier sustancia adecuada para reducir o prevenir la interacción proteína-proteína de Slit2-receptor de Slit2. Los ejemplos de dichas sustancias incluyen un anticuerpo anti-Slit2, un anticuerpo anti-receptor de Slit2, y un fragmento del receptor de Slit2 derivado del dominio extracelular del receptor de Slit2 que es capaz de unirse a Slit2. Puede utilizarse cualquier anticuerpo anti-Slit2 o anticuerpo anti-receptor de Slit2 para reducir o prevenir la interacción proteína-proteína de Slit2-receptor de Slit2, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂.

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con cualquier angiogénesis mediada por Slit2, que incluye la angiogénesis mediada por Slit2 descrita en las siguientes referencias o n.^{os} de registro de GenBank: Dallol *et al.*, Cancer Res., 15 de octubre, 2002, 62(20):5874-5880; Nguyen-Ba-Charvet *et al.*, J. Neurosci., 1 de julio, 2002, 22(13):5473-5480; Ozdinler y Erzurumlu, J. Neurosci., 1 de junio, 2002, 22(11):4540-4549; Plump *et al.*, Neuron, 17 de enero, 2002, 33(2):219-232; Hu, Nat. Neurosci., julio 2001, 4(7):695-701; Nguyen Ba-Charvet *et al.*, J. Neurosci., 15 de junio, 2001, 21(12):4281-4289; Niclou *et al.*, J. Neurosci., 1 de julio, 2000, 20(13):4962-4974; XM_132035 (homólogo 2 de slit de *Mus musculus* (*Drosophila*); NM_022632 (homólogo 2 de slit de *Rattus norvegicus* (*Drosophila*), Liang *et al.*, J. Biol. Chem., 274(25), 17885-17892 (1999)); NM_131735 (homólogo 2 de slit de *Danio rerio* (*Drosophila*), Yeo *et al.*, Dev. Biol., 230(1), 1-17 (2001); y Hutson, L. D. y Chien, Neuron, 33(2), 205-217 (2002)); AK027326 (ADNc de FLJ14420 fis de *Homo sapiens*, clon HEMBA1005581, muy similar a SLIT2 de *Homo sapiens*); AF210321 (Slit2 de *Danio rerio*, Yeo *et al.*, Dev. Biol., 230(1), 1-17 (2001)); NM_004787 (homólogo 2 de slit de *Homo sapiens*, Itoh *et al.*, Brain Res. Mol. Brain Res., 62(2), 175-186 (1998); Holmes *et al.*, Mech. Dev., 79(1-2), 57-72 (1998); Wang *et al.*, Cell, 96(6), 771-784 (1999); Brose *et al.*, Cell, 96(6), 795-806 (1999); AF144628 (SLIT2 de *Mus musculus*, Yuan *et al.*, Dev. Biol., 212(2), 290-306 (1999); AF133270 (SLIT2 de *Homo sapiens*, Wang *et al.*, Cell, 96(6), 771-784 (1999); y Brose *et al.*, Cell, 96(6), 795-806 (1999); y AF055585 (proteína de Slit2 extracelular neurogénica de *Homo sapiens*, Holmes *et al.*, Mech. Dev., 79(1-2), 57-72 (1998)).

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con cualquier angiogénesis mediada por el receptor de Slit2. Por ejemplo, los presentes métodos pueden utilizarse para

prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con cualquier angiogénesis mediada por Slit2-Robo1 o Slit2-Robo4. La interacción de Slit2-Robo1 o Slit2-Robo4 puede reducirse o potenciarse mediante cualquier método adecuado. Preferiblemente, la interacción de Slit2-Robo1 o Slit2-Robo4 se reduce o previene mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una sustancia que reduzca o prevenga la interacción proteína-proteína de Slit2-Robo1 o Slit2-Robo4. Los ejemplos de dichas sustancias pueden ser un anticuerpo anti-Slit2, un anticuerpo anti-Robo1, un anticuerpo anti-Robo4, un fragmento de Robo1 derivado del dominio extracelular de Robo1 que es capaz de unirse a Slit2, y un fragmento de Robo4 derivado del dominio extracelular de Robo4 que es capaz de unirse a Slit2.

Puede utilizarse cualquier anticuerpo anti-Slit2 adecuado, por ejemplo, el anticuerpo anti-Slit2 descrito en Hu, Neuron, agosto de 1999, 23(4):703-711. Puede utilizarse cualquier anticuerpo anti-Robo1 adecuado, por ejemplo, el anticuerpo anti-Robo1 descrito en Hivert *et al.*, Mol. Cell. Neurosci., diciembre de 2002, 21(4):534-545. Preferiblemente, el anticuerpo anti-Robo1 es un anticuerpo contra el primer dominio de inmunoglobulina de Robo1. Más preferiblemente, el anticuerpo contra el primer dominio de inmunoglobulina de Robo1 es R5. Puede utilizarse cualquier fragmento de Robo1 adecuado derivado del dominio extracelular de Robo1, por ejemplo, RoboN.

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con cualquier angiogénesis mediada por Robo1, que incluye la angiogénesis mediada por Robo1 descrita en las siguientes referencias o n.^{os} de registro de GenBank: Hivert *et al.*, Mol. Cell. Neurosci., diciembre de 2002, 21(4):534-545; Clark *et al.*, FEBS Lett., 17 de julio, 2002, 523(1-3):12-16; Dallol *et al.*, Oncogene, 2 de mayo, 2002, 21(19):3020-3028; Xian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 18 de diciembre, 2001, 98(26):15062-15066; XM_139669 (homólogo 1 de roundabout de *Mus musculus*); NM_022188 (homólogo 1 de roundabout de *Rattus norvegicus*, Kidd *et al.*, Cell, 92(2), 205-215 (1998)); AK095256 (ADNc de FLJ37937 fis de *Homo sapiens*, clon CTONG2007272, muy similar a roundabout 1 de *Homo sapiens*); NM_133631 (roundabout de *Homo sapiens*, receptor de orientación de axones, homólogo 1, Kidd *et al.*, Cell, 92(2), 205-215 (1998)); NM_002941 (roundabout de *Homo sapiens*, receptor de orientación de axones, homólogo 1, Kidd *et al.*, Cell, 92(2), 205-215 (1998)); AF304130 (receptor transmembrana de roundabout1 de *Danio rerio*, Challa *et al.*, Mech. Dev., 101(1-2), 249-253 (2001)); AK025535 (ADNc de *Homo sapiens*: FLJ21882 fis, clon HEP02791, muy similar a roundabout 1 AF040990 de *Homo sapiens*, AF041082 (receptor transmembrana de roundabout1 de *Rattus norvegicus*, Kidd *et al.*, Cell, 92(2), 205-215 (1998)); AF040990 (roundabout 1 de *Homo sapiens*, Kidd *et al.*, Cell, 92(2), 205-215 (1998)).

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con cualquier angiogénesis mediada por Robo4, que incluye la angiogénesis mediada por Robo4 descrita en las siguientes referencias o n.^{os} de registro de GenBank: NM_019055 (homólogo 4 de roundabout de *Homo sapiens*); NM_028783 (homólogo 4 de roundabout de *Mus musculus*, Huminiecki *et al.*, Genomics, 79(4), 547-552 (2002); y Nature, 420, 563-573 (2002)); y AF361473 (Huminiecki *et al.*, Genomics, abril de 2002, 79(4):547-552).

La sustancia puede administrarse por sí misma. Preferiblemente, la sustancia se administra con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar cualquier enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2, por ejemplo, isquemia e hipoxia, aterosclerosis, tráfico y reclutamiento de leucocitos, hemostasis, curación de heridas, síndrome de filtración vascular, retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular, psoriasis, artritis reumatoide, hemangioma y cáncer. Preferiblemente, el cáncer es metastásico. También preferiblemente, el cáncer es melanoma maligno, carcinoma escamoso de vejiga, neuroblastoma, cáncer de pulmón microcítico, adenocarcinoma de colon, carcinoma de células de transición de la vejiga, cáncer de mama, carcinoma quístico adenoide de las glándulas salivares, carcinoma hepatocelular o rhabdomyosarcoma.

Los presentes métodos pueden utilizarse para prevenir o tratar cualquier enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en cualquier sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

En una realización específica, el sujeto es un ser humano y la sustancia que se va a administrar al ser humano es un anticuerpo monoclonal humanizado.

C. Composiciones farmacéuticas y combinaciones para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2

En otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en un sujeto, comprendiendo dicha composición farmacéutica una cantidad eficaz de un anticuerpo que reduce o potencia la interacción de Slit2-receptor de Slit2. Preferiblemente, el receptor de Slit2 es Robo1 o Robo4. También preferiblemente, la composición farmacéutica comprende también un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden cualquiera de las sustancias que reducen o potencian la interacción de Slit2-receptor de Slit2 y sus sales farmacéuticamente aceptables, solas o en combinación

con cualquier portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones aceptables y los métodos para su administración que pueden emplearse para su uso en esta descripción incluyen, pero no se limitan a los descritos en las patentes de EEUU n.^{os} 5.736.154; 6.197.801; 5.741.511; 5.886.039; 5.941.868; 6.258.374 y 5.686.102. Los ejemplos de portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no se limitan a intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humana, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, bifosfato de disodio, bisfosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice colidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias con una base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina anhidra.

La formulación, la dosificación y la vía de administración pueden determinarse según métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro (editor), Mack Publishing Company, abril de 1997; *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Banga, 1999; y *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, Hovgaard y Frkjr (ed.), Taylor & Francis, Inc., 2000; *Biopharmaceutical Drug Design and Development*, Wu-Pong y Rojanasakul (ed.), Humana Press, 1999). Para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2, un nivel de dosificación apropiado será en general de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal diarios. Preferiblemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg diarios. En realizaciones más preferidas, el nivel de dosificación variará de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg diarios. La dosificación apropiada puede administrarse en una dosis individual o múltiple. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier sujeto concreto puede variarse y dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico utilizado, la estabilidad metabólica y la longitud de acción del compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, vía y momento de la administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad del trastorno concreto, y el paciente que está recibiendo la terapia.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante pulverizado para inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, mediante un depósito implantado, o mediante cualquier forma adecuada de administración. El término parenteral, tal como se emplea en la presente, incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal. La vía más adecuada en cualquier caso concreto dependerá de la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando y de la naturaleza de la sustancia que reduce o potencia la interacción de Slit2-receptor de Slit2 que se está usando.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según técnicas conocidas en la técnica, empleando agentes dispersantes o humectantes adecuados (por ejemplo, Tween 80), y agentes suspensores. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede ser una disolución en 1,3-butandiol. Otros ejemplos de vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse en las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a manitol, agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean de modo convencional aceites no volátiles estériles como medio disolvente o de suspensión. Para este objetivo puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles para la preparación de inyectables, así como los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxiethyladas. Estas disoluciones o suspensiones de aceites también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a cápsulas, comprimidos y suspensiones y disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para un uso oral, los vehículos que se emplean habitualmente incluyen, pero no se limitan a lactosa y almidón de maíz. También pueden añadirse agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz secado. Cuando las suspensiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulgentes y suspensores. Si se desea pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse en forma de supositorios para la administración rectal. Estas composiciones pueden prepararse mezclando un compuesto de esta invención con un excipiente no irritante adecuado. En realizaciones concretas, el excipiente es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal. Así, el excipiente se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Estos materiales incluyen, pero no se limitan a manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante inhalación o aerosol nasal. Estas composiciones se preparan según técnicas muy conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica. Por

ejemplo, estas composiciones pueden prepararse como disoluciones en disolución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes y estimulantes de la absorción adecuados para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse por vía tópica. Para la aplicación tópica a la piel, la composición farmacéutica puede formularse con un ungüento adecuado que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en un vehículo. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenglicol, compuesto de polioxietileno y polioxipropileno, cera emulgente y agua. Como alternativa, la composición farmacéutica puede formularse con una loción o crema adecuada que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden aplicarse por vía tópica al tracto intestinal inferior mediante una formulación en supositorios rectales o en una formulación en enema adecuada. También se incluyen en la invención los parches transdérmicos tópicos.

La invención también proporciona kits para realizar los regímenes terapéuticos de la invención. Estos kits comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de una sustancia que reduce o potencia la interacción de Slit2-ligando de Slit2, sola o en combinación con otros agentes, en una forma farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas preferidas incluyen inhibidores en combinación con disolución salina estéril, disolución de dextrosa, disolución tamponada u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la composición puede liofilizarse o desecarse. En este caso, el kit también puede comprender una disolución farmacéuticamente aceptable, preferiblemente estéril, para formar una disolución para inyección. En otra realización, el kit puede comprender también una aguja o una jeringa, preferiblemente envasada en forma estéril, para inyectar la composición. En otras realizaciones, el kit comprende también un medio de instrucciones para administrar la composición a un sujeto. El medio de instrucciones puede ser un inserto escrito, una audiocinta, una cinta audiovisual, o cualquier otro medio para dar instrucciones acerca de la administración de la composición a un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a una combinación para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en un sujeto, comprendiendo dicha combinación: a) una cantidad eficaz de una sustancia que reduce o potencia la interacción de Slit2-ligando de Slit2; y b) una cantidad eficaz de una sustancia que reduce o potencia la angiogénesis.

En las combinaciones puede utilizarse cualquier agente antiangiogénico, incluyendo los descritos en la presente, que cuando se emplea solo o en combinación con otros compuestos, puede aliviar, reducir, mejorar, prevenir, o colocar o mantener en un estado de remisión a los síntomas clínicos o los marcadores de diagnóstico asociados con una angiogénesis no deseada y/o incontrolada, en particular neoplasmas sólidos, malformaciones vasculares y trastornos cardiovasculares, enfermedades inflamatorias crónicas y reparaciones aberrantes de heridas, trastornos circulatorios, síndromas de cresta, trastornos dermatológicos o trastornos oculares.

En una realización específica, el agente antiangiogénico utilizado en la combinación es un inhibidor de la degradación de la membrana basal, un inhibidor de la migración celular, un inhibidor de la proliferación de células endoteliales, un inhibidor de la organización tridimensional y el establecimiento de la patencia, o un tratamiento antiangiogénico fisiológico o físico.

Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a inhibidores de proteasas, endostatina, taxol, TGF-, inhibidores de FGF (véase, Auerbach y Auerbach, *Pharmacol. Ther.*, 63(3): 265-311 (1994) para un listado exhaustivo de agentes antiangiogénicos muy conocidos). Los agentes antiangiogénicos concretos utilizados en la combinación incluyen AGM-1470 (TNP-470), esteroides angiostáticos, angiostatina, anticuerpos contra av 3, anticuerpos contra bFGF, anticuerpos contra IL-1, anticuerpos contra TNF- α , anticuerpos contra VEGF, auranofina, azatioprina, BB-94, BB-2516, receptor soluble de FGF básico, carboxiamidotrizol (CAI), inhibidor derivado del cartílago (CDI), quitina, cloroquina, cisplatino, CM 101, cortisona/heparina, cortisona/hialuroflano, cortexolona/heparina, CT-2584, ciclofosfamida, ciclosporina A, dexametasona, diclofenaco/hialuronano, proteína básica mayor eosinófila, péptidos de fibronectina, factor inhibidor de la angiogénesis derivado de glioma (GD-AIF), GM 1474, cloruro de oro, tiomolato de oro, heparinasas, hialuronano (especies de alto y bajo peso molecular), hidroclortisona/beta-ciclodextrano, ibuprofeno, indometacina, interferón-alfa, proteína 10 inducible por interferón-gamma, interferón-gamma, IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, laminina, levamisol, linomida, LM609, marimastato (BB-2516), medroxiprogesterona, metastato (Col-3), metotrexato, minociclina, óxido nítrico, octreotida (análogo de somatostatina), paclitaxel, D-penicilamina, polisulfato de pentosano, proteína relacionada con la proliferina placentaria, inhibidor de ARNasa de placenta, inhibidor del activador de plasminógeno (PAI), factor de plaquetas-4 (PF4), prednisolona, prolactina (fragmento de 16 Kda), proteína relacionada con la proliferina, inhibidor de la prostaglandina sintasa, protamina, retinoides, roquinimex (LS-2616, linomida), somatostatina, sustancia P, suramina, SU 101, tecogalano sodio (DS-4152), tetrahidrocortisol-S, tromboespondinas (TSP), inhibidor de metaloproteinasas tisular (TIMP 1, 2, 3), inhibidores del factor del crecimiento endotelial vascular, vitamina A, vitaxina, fluidos vítreos, talidomida, 3-aminotalidomida, 3-hidroxitolidomida y los metabolitos o productos de la hidrólisis de la talidomida, 3-aminotalidomida, o 3-hidroxitolidomida (O'Reilly, *Investigational New Drugs*, 15:5-13 (1997); *J. Nat'l Cancer Inst.*, 88:786-788 (1996); patentes de EEUU n.ºs 5.593.990, 5.629.327 y 5.712.291).

C. Agente proangiogénico

En las presentes combinaciones puede utilizarse cualquier agente proangiogénico, incluyendo los descritos en la presente, que cuando se emplea solo o en combinación con otros compuestos, puede estimular la angiogénesis fisiológica, en particular la angiogénesis implicada en el desarrollo y crecimiento placentario, embrionario, fetal y postnatal normal, el desarrollo fisiológicamente cíclico en el folículo ovárico, el cuerpo lúteo y el endometrio postmenstrual, o la curación de heridas.

El agente proangiogénico utilizado en la combinación puede ser una citoquina proangiogénica (Desai y Libutti, *J. Immunother.*, 22(3):186-211 (1999)). Más preferiblemente, la citoquina proangiogénica utilizada es un factor del crecimiento de fibroblastos básico, tal como bFGF y FGF-2, un factor del crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular, tal como VEGF/VPF y vasculotropina, un factor del crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, tal como PD-EDGF y timidina fosforilasa, un factor del crecimiento transformante-beta (TGF-beta), o angiopoyetina-1 (Ang-1).

Para tratar el cáncer puede utilizarse cualquier agente antineoplasma en la combinación de la presente invención. Los ejemplos de agentes antineoplasma que pueden utilizarse en las composiciones y los métodos de la presente descripción se describen en la solicitud de patente de EEUU n.º 2002/044919. En una realización, el agente antineoplasma utilizado es un agente antiangiogénico. El agente antiangiogénico puede ser un inhibidor de la degradación de la membrana basal, un inhibidor de la migración celular, un inhibidor de la proliferación de células endoteliales, y un inhibidor de la organización tridimensional y el establecimiento de la potencia. Los ejemplos de dichos agentes antiangiogénicos se ilustran en Auerbach y Auerbach, *Pharmacol. Ther.*, 63:265-311 (1994); O'Reilly, *Investigational New Drugs*, 15:5-13 (1997); *J. Nat'l Cancer Instit.*, 88:786-788 (1996); y las patentes de EEUU n.ºs 5.593.990; 5.629.327 y 5.712.291. En otra realización, el agente antineoplasma utilizado es un agente alquilante, un antimetabolito, un producto natural, un complejo de coordinación de platino, una antracendiona, una urea sustituida, un derivado de metilhidrazina, un supresor adrenocortical, una hormona y un antagonista.

Otros agentes antineoplasma incluyen, pero no se limitan a citidina, arabinosiladenina (araC), daunomicina, doxorubicina, metotrexato (MTX), pirimidinas fluoradas, tales como 5-fluorouracilo (5-FU), hidroxiurea, 6-mercaptopurina, alcaloides vegetales, tales como vincristina (VCR), VP-16 y vinblastina (VLB), agentes alquilantes, cisplatino, gas mostaza, trisamina, procarbazona, bleomicina, mitomicina C, actinomicina D, o una enzima, tal como L-asparaginasa. El agente antineoplasma también puede ser un inhibidor de oncogenes, tal como un anticuerpo anti-oncogén o un oligonucleótido antisentido anti-oncogén. En otra realización, el agente antineoplásico es un inhibidor de la matriz celular, tal como un anticuerpo anti-matriz celular o un oligonucleótido antisentido anti-matriz celular. Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos y oligonucleótidos antisentido contra caveolina-1, decorina, caderinas, cateninas, integrinas, y otros compuestos de la matriz celular o genes de la matriz celular.

En una realización específica, la combinación comprende también un gen supresor de tumor para una terapia génica y terapia intratumoral combinadas. El gen puede utilizarse en forma de ADN desnudo, ADN complejo, ADNc, ADN plasmídico, ARN u otras mezclas de estos, como componentes del sistema de transporte de genes. En otra realización, el gen supresor de tumor se incluye en un vector vírico. En la combinación puede utilizarse cualquier vector vírico que sea adecuado para una terapia génica. Por ejemplo, puede utilizarse un vector adenovírico (patente de EEUU n.º 5.869.305), un vector de virus de simio (patente de EEUU n.º 5.962.274), un vector del virus de la inmunodeficiencia humana de replicación condicional (patente de EEUU n.º 5.888.767), retrovirus, SV40, vectores del amplicón del virus del herpes simplex, y vectores de virus vaccinia. Además, los genes pueden transportarse en un sistema de vector no vírico, tal como un liposoma, en los que el lípido protege al ADN u otros biomateriales de la oxidación durante la coagulación.

D. Métodos y kits para el pronóstico o el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2

En otro aspecto, la presente descripción se dirige a un método para el pronóstico o el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en un sujeto, comprendiendo dicho método: a) obtener una muestra de ensayo de un sujeto de ensayo y ensayar el nivel de Slit2 y/o del receptor de Slit2 en dicha muestra de ensayo; b) obtener una muestra control a partir de un sujeto control que no tiene una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2, y evaluar el nivel de Slit2 y/o del receptor de Slit2 en dicha muestra control; y c) comparar los niveles de Slit2 y/o del receptor de Slit2 evaluados en a) y b), por lo cual un nivel elevado de Slit2 y/o del receptor de Slit2 en dicho sujeto de ensayo con relación al nivel de Slit2 y/o del receptor de Slit2 en en dicho sujeto control indica que dicho sujeto de ensayo tiene dicha enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2. Preferiblemente, el receptor de Slit2 es Robo1 o Robo4. El nivel de Slit2 y/o del receptor de Slit2 puede evaluarse al nivel adecuado, por ejemplo, al nivel de ácido nucleico o de proteína.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un kit para el pronóstico o el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociado con la angiogénesis mediada por Slit2 en un sujeto, comprendiendo dicho kit: a) un medio para obtener una muestra de ensayo de un sujeto de ensayo y una muestra control de un sujeto control; b) un medio para evaluar el nivel de Slit2 y/o del receptor de Slit2 en dichas muestras de ensayo y control; y c) un medio para

comparar los niveles de Slit2 y/o del receptor de Slit2 evaluados en dichas muestras de ensayo y control. Preferiblemente, el receptor de Slit2 es Robo1 o Robo4.

E. Ejemplos

La angiogénesis es un proceso celular de germinación de capilares y de configuración de neovasculaturas a partir de vasos sanguíneos existentes. Desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la isquemia y la hipoxia, la aterosclerosis, el reclutamiento y tráfico de leucocitos, la hemostasis, la curación de heridas, el síndrome de filtración vascular, la retinopatía diabética, la degeneración macular, el glaucoma neovascular, la psoriasis, la artritis reumatoide, el hemangioma, y la metástasis y el crecimiento de cánceres. Slit2, una proteína expresada en células de la línea media y células endoteliales, reacciona con una proteína transmembrana de la superficie celular, Roundabout1 (Robo1), y actúa como repelente en la orientación y ramificación de axones, la migración neuronal, y como inhibidor endógeno para la quimiotaxis de leucocitos. Los inventores han descubierto la expresión de Slit2, en un gradiente céntrico, en cánceres humanos, y de Robo1 en células endoteliales tumorales. La proteína Slit2 recombinante atrae la migración y estimula la formación de tubos de células endoteliales de una manera dependiente de Robo1. La neutralización específica de esta interacción reduce notablemente los vasos sanguíneos tumorales y las masas de melanoma maligno de células A375 humano *in vivo*. Estos descubrimientos indican un modelo de diálogo entre las células cancerosas y las células endoteliales vasculares para su suministro de sangre e implica una intervención dirigida a la angiogénesis mediada por Slit2 para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de los anteriores trastornos.

Expresiones de Slit2 en células A375 y Robo1 en células endoteliales

Empleando una transcripción inversa semicuantitativa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), los inventores han descubierto que las células A375, una línea celular derivada de un melanoma maligno humano, expresan ARNm de Slit2, y que las células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) expresan ARNm de Robo1, respectivamente (figura 1a y e). Las expresiones de ARNm de Slit2 en células A375 y de ARNm de Robo1 en HUVEC fueron confirmadas mediante transferencia Northern con fragmentos de ADNc de Slit2 y Robo1 marcados con ³²P (figura 1b y f). Las expresiones de la proteína Slit2 en células A375 (figura 1c) y tumores sólidos de células A375 (figura 1h e i) y de la proteína de Robo1 en HUVEC (figura 1g) y células endoteliales tumorales (figura 1i) fueron detectadas mediante inmunotransferencia y tinción inmunohistoquímica con Ab anti-Slit2 y anti-Robo1, pero no con IgG preinmunológica (figura 1c, g, h e i). En coherencia con los informes previos, se ha descubierto que Slit2 está localizada sobre la superficie celular (figura 1h e i). De modo similar, los inventores han descubierto que la mayoría de Slit2 estaba asociada con células A375 en las condiciones de cultivo celular, aunque también se detectó una pequeña cantidad de Slit2 en los sobrenadantes (los datos no se muestran). De modo notable, parece haber un gradiente de Slit2 en los tumores sólidos, estando la tinción de menor densidad en la periferia y la tinción de mayor densidad en el centro (figura 1h). Las expresiones *in situ* de Slit2 en melanomas malignos y de Robo1 en células endoteliales tumorales sugiere así una posible interacción paracrina de Slit2/Robo1 en la patogénesis de cánceres.

Migraciones y formación de tubos inducidas por Slit2

Puesto que varias pistas migratorias "neurológicas" pueden inducir la angiogénesis, resulta intrigante investigar si Slit2 tiene actividad angiogénica. Durante el proceso angiogénico, las células endoteliales vasculares sufren migración, diferenciación y proliferación. En primer lugar, los inventores investigaron si Slit2 tenía algún efecto quimiotáctico sobre la migración de HUVEC utilizando el ensayo de la cámara de Boyden. Tal como se esperaba, la Slit2 humana recombinante (figura 1d) en las cámaras inferiores, al igual que bFGF (factor del crecimiento de fibroblastos básico), induce la migración de HUVEC de una manera dependiente de la dosis (figura 2a). Una preincubación de Slit2 con RoboN (un fragmento extracelular de Robo1^{5,8}) o una preincubación de HUVEC con R5 (un anticuerpo monoclonal IgG_{2b} contra el primer dominio de IgG de Robo1, figura 4g) neutraliza significativamente la migración inducida por Slit2; sin embargo, RoboN o R5 no afectan a la migración inducida por bFGF de HUVEC (figura 2a y b). Estos resultados indican que Slit2 puede mediar en la migración de HUVEC.

Para determinar la importancia funcional de Robo1, los inventores realizaron experimentos de reconstitución utilizando células 293/Robo1 (Li, H. S. *et al.*, *Cell*, 96:807-818 (1999)). De forma notable, tanto Slit2 como bFGF estimularon la migración de las células 293/Robo1, pero RoboN solo neutralizó la migración de las células 293/Robo1 inducida por Slit2, pero no la inducida por bFGF (figura 2c). Además, bFGF, pero no Slit2, activó la migración de células 293/V. Evidentemente, Robo1 resulta fundamental para las migraciones de células inducidas por Slit2.

Para corroborar los anteriores descubrimientos, los inventores realizaron experimentos en los que se genera un gradiente de Slit2 o bFGF para controlar la migración direccional de HUVEC. En efecto, HUVEC migraron hacia una mayor concentración de Slit2, atestiguando la direccionalidad atractiva para la migración inducida por Slit2 de las células endoteliales (figura 2d, e y f). bFGF induce la migración de HUVEC; sin embargo, esta migración no es direccional (figura 2d, e y f). RoboN añadido en el baño neutraliza la migración direccional inducida por Slit2, pero no tiene efectos inhibidores sobre la migración inducida por bFGF (figura 2e y f). Estos datos indican que Slit2 puede atraer la migración direccional de células endoteliales vasculares mediante su interacción con Robo1. Esto contrasta

notablemente con el efecto repulsivo de Slit2 sobre las neuronas y con el efecto migratorios no direccional o aleatorio de bFGF sobre HUVEC.

Después los inventores estudiaron si Slit2 puede inducir la formación de tubos de HUVEC. En efecto, Slit2 facilita la formación de tubos de HUVEC de una manera dependiente de la dosis (figura 2g y h). bFGF también estimula la tubulogénesis. La preincubación de Slit2 con RoboN o la preincubación de HUVEC con R5 neutraliza el efecto de Slit2, dando como resultado unas estructuras tubulares en menor número y más cortas (figura 2h e i). Así, los resultados de los inventores indican que Slit2 tiene actividad angiogénica *in vitro*. Debe mencionarse que Slit2 no tiene actividad detectable sobre la proliferación de HUVEC (los datos no se muestran).

Inhibición de la angiogénesis tumoral y el crecimiento del melanoma maligno

Puesto que las células A375 expresan Slit2, y Slit2 induce la migración y la formación de tubos de células endoteliales *in vivo*, el impulso de los inventores fue evaluar la importancia patológica de la interacción de Slit2/Robo1 en la angiogénesis tumoral en un modelo animal. Para neutralizar específicamente esta interacción *in vivo*, se establecieron tres clones de células individuales que expresan RoboN (células A375_C1, C2 y C3/RoboN) y un clon de una sola célula que expresa de modo estable el vector sencillo (células A375/V). Fueron caracterizados mediante inmunotransferencia para las expresiones de RoboN y Slit2 (figura 3a), y se ensayaron para sus velocidades de crecimiento *in vitro* para asegurarse de que todos crecían a velocidades similares en las condiciones de cultivo celular (figura 3b).

Después se inocularon por vía subcutánea en ratones "nude" atímicos. Cuando se comparan con los de las células A375/V, los tumores sólidos de las células A375_C1, C2 y C3/RoboN presentaban reducciones significativas en la densidad de los vasos (figura 3c y d). Por consiguiente, los tumores de las células A375_C1, C2 y C3/RoboN crecieron mucho más lentamente (figura 3e). Como estrategia alternativa, los inventores ensayaron R5, un anticuerpo monoclonal que bloquea IgG_{2b} contra Robo1, y descubrieron que también reduce claramente los vasos y las masas tumorales (figura 3g-k). Estos resultados *in vivo* demuestran la importancia biológica de la interacción de Slit2/Robo1 en la angiogénesis y el crecimiento del melanoma maligno humano.

Puesto que las células endoteliales expresan Slit2 y Robo1, y Slit2 inhibe la quimiotaxis de leucocitos⁹, los inventores midieron los recuentos de leucocitos en la sangre y en los tumores sólidos²⁹. No descubrieron diferencias claras entre estos grupos (figura 3f y l). La cantidad de leucocitos dentro de los tumores sólidos fue confirmada mediante tinción de H&E de secciones de tejido (los datos no se muestran). Estos datos aparentemente dan razones en contra de la implicación fundamental de los leucocitos, mediada por Slit2, en la patogénesis del melanoma maligno. La tinción muy débil de Slit2 en células endoteliales tumorales (figura 1i y 4c) también da razones en contra del papel fundamental de una potencial interacción autocrina de Slit2/Robo1 durante el desarrollo de tumores sólidos.

Expresión de Slit2 en cánceres humanos

Para explorar las implicaciones de los descubrimientos de los inventores, estos estudiaron si líneas de células cancerosas humanas originadas de diferentes tejidos y órganos expresaban Slit2. En efecto, Slit2 es expresada en células A375 (melanoma maligno), células SCaBER (carcinoma escamoso de vejiga), células SK-N-SH (neuroblastoma), células NCI-H446 (cáncer de pulmón microcítico), células LoVo (adenocarcinoma de colon), células T24 (carcinoma de células de transición de la vejiga), células ZR-75-30 (cáncer de mama), células Acc-2 y Acc-M (carcinoma quístico adenoide de las glándulas salivares), células SMMC-7721 (carcinoma hepatocelular) y células A673 (rabdomyosarcoma; figura 4a). Pero Slit2 parece estar ausente en células A549 (cáncer de pulmón), células HeLa (adenocarcinoma epitelial cervical), células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y células 786-O (adenocarcinoma de células renales primario). Aún debe determinarse si las células HCT-8 (adenocarcinoma colorrectal ileocecal; una banda principal a aproximadamente 130 kDa) y las células CNE (cáncer nasofaríngeo; una banda principal a aproximadamente 130 kDa y una banda secundaria a aproximadamente 100 kDa) expresan Slit2, que puede estar parcialmente degradado.

El descubrimiento de la expresión de Slit2 en una diversidad de líneas de células cancerosas es coherente con el reciente informe de la expresión de Slit2 en cánceres de próstata utilizando una estrategia basada en RT-PCR¹⁹. A lo largo de esta línea de investigación, los inventores estudiaron el melanoma maligno humano, el adenocarcinoma mucinoso rectal, el carcinoma de mama invasivo, y el carcinoma hepatocelular, y descubrieron que todos expresaban Slit2 (figura 4b). De modo notable, dentro de las secreciones del carcinoma de mama, aparentemente hay más tinción de Slit2 en las manchas en las que existen más células cancerosas y vasos sanguíneos (figura 4c). Por contraste, había menos tinción de Slit2 en emplazamientos en los que había menos células cancerosas y vasos sanguíneos. Se observaron manifestaciones similares para el carcinoma hepatocelular humano, pero no fueron obvias para el melanoma maligno y el adenocarcinoma mucinoso rectal (los datos no se muestran). Estas correlaciones directas aparentemente implican la importancia funcional de la angiogénesis tumoral inducida por Slit2 en la patogénesis de diversos cánceres humanos.

En conclusión, los descubrimientos de los inventores indican un modelo de diálogo entre las células cancerosas y las células endoteliales vasculares para el suministro de sangre de los cánceres. El hecho de que la abrogación de

esta interacción de Slit2/Robo1 puede atenuar la formación de vasos y, en consecuencia, el crecimiento del cáncer, demuestra la importancia funcional de esta pareja molecular para el suministro de sangre del melanoma maligno. Puesto que la mayoría de las células cancerosas originadas de diferentes tejidos y órganos y diversos cánceres humanos expresan Slit2, los inventores creen que la importancia patológica de la interacción de Slit2/Robo1 en la angiogénesis tumoral merece más estudios.

Métodos de RT-PCR y transferencia Northern

Se cultivaron HUVEC primarias tal como se ha descrito previamente (Geng, J.-G. *et al.*, *Nature*, 343:757-760 (1990)). Se realizó una RT-PCR semicuantitativa tal como se ha descrito previamente (Ma, Y.-Q. y Geng, J.-G., *J. Immunol.*, 165:558-565 (2000)). Los cebadores utilizados fueron el cebador de Robo1 humano sentido (+4440) 5'-CCT ACA CAG ATG ATC TTC C-3' (SEQ ID NO:1) y antisentido (-4956) 5'-CAG AGG AGC CTG CAG CTC AGC TTT CAG TTT CCT C-3' (SEQ ID NO:2); Slit2 humana sentido (+3611) 5'-GGT GAC GGA TCC CAT ATC GCG GTA GAA CTC-3' (SEQ ID NO:3) y antisentido (-4574) 5'-GGA CAC CTC GAG CGT ACA GCC GCA CTT CAC-3' (SEQ ID NO:4); β -actina humana sentido (+1) 5'-ATG GAT GAT GAT ATC GCC GC-3' (SEQ ID NO:5) y antisentido (-1127) 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG G-3' (SEQ ID NO:6). También se sondaron los ARN totales procedentes de células A375 y el cultivo primario de HUVEC con los fragmentos de ADNc de Slit2 o Robo1 marcados con ^{32}P .

Métodos de generación de anticuerpos, inmunotransferencia e inmunotinción

Se construyeron proteínas de fusión Slit2-GST (que codifica los aminoácidos 57-207 del ADNc de Slit2 humana) y Robo1-GST (que codifica los aminoácidos 1-168 o 961-1217 del ADNc de Robo1 de rata) en un vector pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas de fusión purificadas se utilizaron como antígenos para inmunizar conejos y ratones para la generación de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-Slit2 y anti-Robo1. Se emplearon cantidades iguales de lisados celulares para la inmunotransferencia. Se realizaron estudios inmunohistoquímicos tal como se describió previamente (Liu, L.-P. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286:281-291 (2001)).

Métodos de aislamiento de Sli2 y RoboN

Se estableció una línea de células 293 de riñón embrionario humano estable que segrega Slit2 humana de longitud completa con un marcador myc en su carboxilo terminal (células 293/Slit2), tal como se describió previamente (Li, H. S. *et al.*, *Cell*, 96:807-818 (1999); Wang, K.-H. *et al.*, *Cell*, 96:771-784 (1999)). La proteína Slit2 muy purificada se obtuvo a partir del medio condicionado mediante una cromatografía de afinidad utilizando el mAb 9E10 contra el marcador myc (aproximadamente 1 mg ml⁻¹ de Affi-Gel 10; Bio-Rad). La tinción con plata y la inmunotransferencia de Slit2 purificada se realizó como se ha descrito (Ma, L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:27739-27746 (1994)).

Se estableció una línea de células 293 estable que sobreexpresa la porción extracelular de Robo1 con un marcador de hemoaglutinina en su carboxilo terminal (RoboN) como se ha descrito (Li, H. S. *et al.*, *Cell*, 96:807-818 (1999); Whitford, K. L. *et al.*, *Neuron*, 33:47-61 (2002)). Se emplearon esferas de afinidad acopladas con un mAb contra hemoaglutinina, HA11 (BAbCO), para purificar RoboN a partir del medio condicionado como se ha descrito.

Métodos del ensayo de la cámara de Boyden

El ensayo de migración de células se realizó en una cámara de microquimiotaxis de 48 pocillos (Neuro Probe, Inc.) (Terranova, V. P. *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 101:2330-2334 (1985)). Se revistieron membranas de policarbonato sin PVP (poros de 8 μm) con gelatina al 1%. Las cámaras inferiores se cargaron con o sin Slit2 o bFGF (Sigma), mientras que las cámaras superiores se sembraron con HUVEC, células 293/Robo1 o células 293/V (todas a 5×10^5 células ml⁻¹) resuspendidas en medio M199 suplementado con suero de ternera feral inactivado con calor al 1% (FCS). Se incubaron a 37 °C durante 4 h. Después se fijaron los filtros, se tiñeron con violeta cristal al 0,5% y se contaron las células que migraron a través de los filtros.

Métodos del ensayo de migración direccional

Se produjeron gradientes microscópicos de proteínas como se ha descrito (Höpker, V. H. *et al.*, *Nature*, 401:69-73 (1999)). Brevemente, se aplicó una inyección de presión repetitiva de volúmenes de picolitros de Slit2 0,15 μM o bFGF 1 μM a través de una micropipeta con una punta en la abertura de aproximadamente 1 μm . La placa de cultivo de 24 pocillos se revistió con una capa fina de Matrigel (Becton Dickinson Labware) y se dejó que las células de ensayo se posasen y se fijasen laxamente al Matrigel. Los experimentos se realizaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5%. La punta de la pipeta se colocó a 100 μm del centro de cualquier célula en ensayo. Se registraron imágenes microscópicas con una cámara CCD (JVC) unida a un microscopio de contraste de fase (Olympus IX70) y se almacenaron en un ordenador para un análisis detallado utilizando NIH Image. Se analizaron las distancias de migración de las HUVEC a las 2 h.

Métodos del ensayo de formación de tubos

Las placas de cultivo celular de 96 pocillos se revistieron con 100 μl /pocillo de Matrigel y se incubaron a 37 °C

durante 30 min para estimular la gelificación (Malinda, K. M. *et al.*, Identification of laminin α 1 and β 1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation and aortic sprouting, *FASEB J.*, 13:53-62 (1999)). Las HUVEC (transferencias 2 a 3) se resuspendieron a $1,3 \times 10^5$ células por pocillo en medio M199 suplementado con suero de ternera fetal inactivado con calor al 2%. Se añadieron partes alícuotas de células (0,1 ml por parte alícuota) a cada pocillo que contiene Matrigel. Las estructuras tubulares se registraron y se fotografiaron de 12 a 18 h.

Métodos del modelo de crecimiento de tumor xenoinjertado

Se transfectaron células A375 utilizando Lipofectin™ (Gibco) y se seleccionaron mediante higromicina B $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Sigma). Se verificaron las células A375_C1, C2 y C3/RoboN, así como las células A375/V, mediante inmunotransferencia con anticuerpos contra Robo1, Slit2 y tubulina (como control de carga). Se resuspendieron en una parte alícuota de 0,2 ml de medio DME y se inyectaron por vía subcutánea en ratones "nude" atímicos (O'Reilly, M. S. *et al.*, Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell*, 88:277-285 (1997)). Para los experimentos de inhibición de anticuerpos, los ratones que portan tumores de células A375 se trataron con inyecciones intraperitoneales de R5 o IgG_{2b} control dos veces semanales (1 mg por inyección) (Müller, A. *et al.*, *Nature*, 410:50-56 (2001)). Los ratones se sacrificaron 30-35 días después. Se recogió sangre de los ratones antes del sacrificio para los recuentos de leucocitos, y se realizaron mediciones para las actividades mieloperoxidasa de los neutrófilos dentro de los tumores sólidos como se ha descrito (Wang, J.-G. *et al.*, *Inflamm. Res.*, 51:435-443 (2002)).

Métodos del ensayo de proliferación celular

Todos los transfectantes se cultivaron en fase exponencial y se desprendieron mediante un tratamiento con tripsina. Las células viables (5×10^3 células ml^{-1}) se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos en 100 μl de medio completo a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. En diferentes momentos se añadió sal tetrazolio (20 μl por pocillo) y se incubó a 37 °C durante 4 h. El producto de formazano azul insoluble se solubilizó mediante la adición de 100 μl /pocillo de SDS al 10%/isobutanol al 5%. Las placas se leyeron en un lector de placas de microtitulación utilizando una longitud de onda de ensayo de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm.

Los anteriores ejemplos se incluyen solo con objetivos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención, que solo está limitada por el alcance de las reivindicaciones adjuntas; son posibles muchas variaciones con respecto a lo descrito anteriormente, y las modificaciones y las variaciones a los ejemplos descritos anteriormente (que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas) serán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso de un compuesto para la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis tumoral mediada por Slit2 en un sujeto, en el que el medicamento es eficaz para reducir la interacción proteína-proteína de Slit2-receptor de Slit2 en el sujeto hasta un nivel suficiente para inhibir la angiogénesis tumoral mediada por Slit2, y en el que el tumor es un cáncer de tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en carcinoma quístico adenoide de las glándulas salivares y carcinoma hepatocelular, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-Slit2, un anticuerpo anti-receptor de Slit2 y un fragmento del receptor de Slit2 derivado del dominio extracelular del receptor de Slit2 que es capaz de unirse a Slit2.
- 2.- El uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-Slit2 o el anticuerpo anti-receptor de Slit2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂.
- 3.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el receptor de Slit2 es Robo1 o Robo4.
- 4.- El uso de la reivindicación 3, en el que el receptor de Slit2 es Robo1, y el anticuerpo es un anticuerpo anti-Slit2 o un anticuerpo anti-Robo1.
- 5.- El uso de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-Robo1 es un anticuerpo contra el primer dominio de inmunoglobulina de Robo1.
- 6.- El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento se administra con un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 7.- El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer es metastásico.
- 8.- El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un mamífero.
- 9.- El uso de la reivindicación 8, en el que el mamífero es un ser humano.
- 10.- El uso de la reivindicación 9, en el que el medicamento que se va a administrar es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 11.- Una composición farmacéutica para inhibir la angiogénesis asociada a tumores mediada por Slit2 en un sujeto, en la que la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un compuesto que reduce la interacción de Slit2-receptor de Slit2, en la que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-Slit2, un anticuerpo anti-receptor de Slit2 y un fragmento del receptor de Slit2 derivado del dominio extracelular del receptor de Slit2 que es capaz de unirse a Slit2.
- 12.- La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el receptor de Slit2 es Robo1 o Robo4.
- 13.- La composición farmacéutica de las reivindicaciones 11 o 12, que comprende además un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

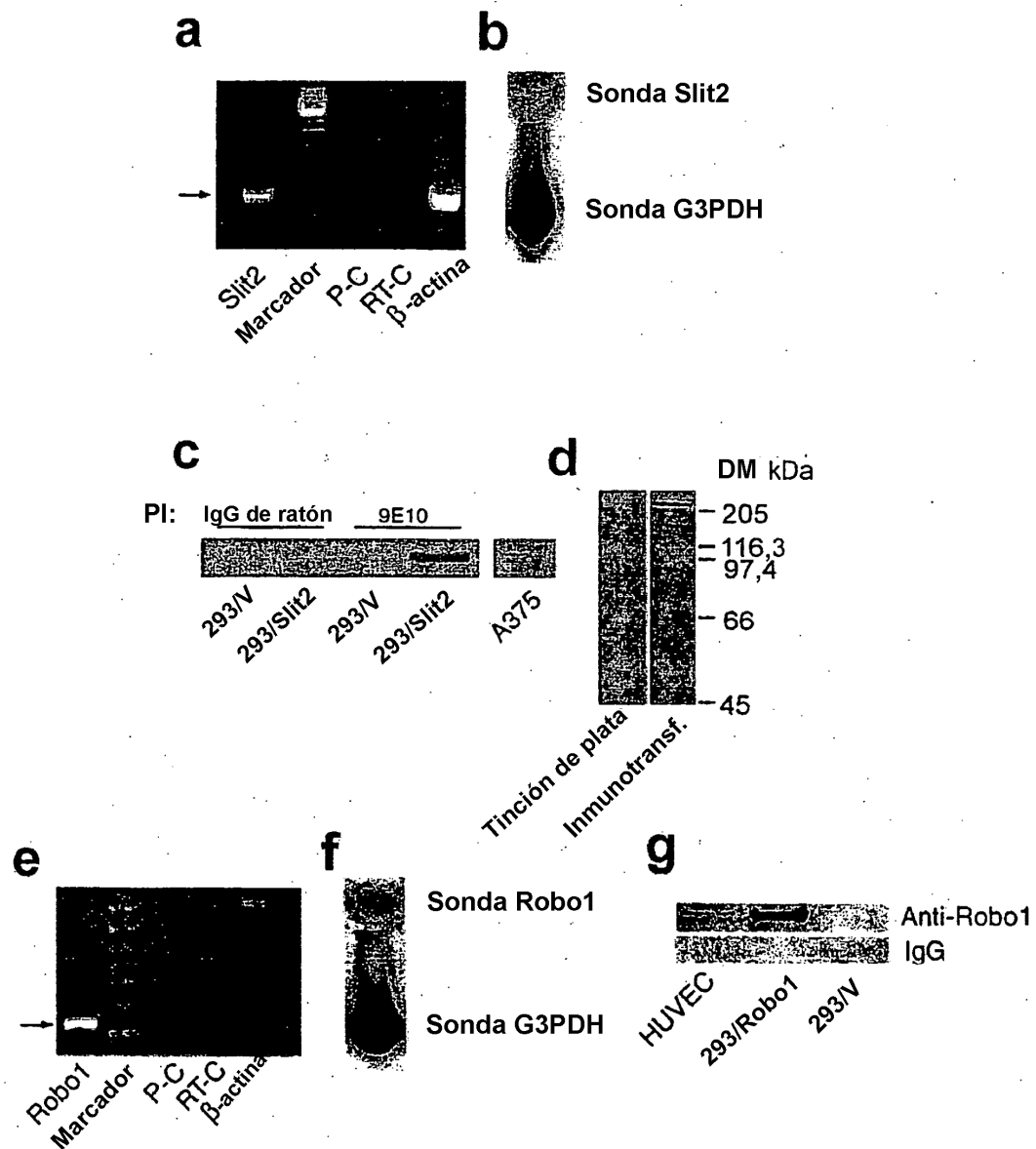


FIGURA 1 a-g

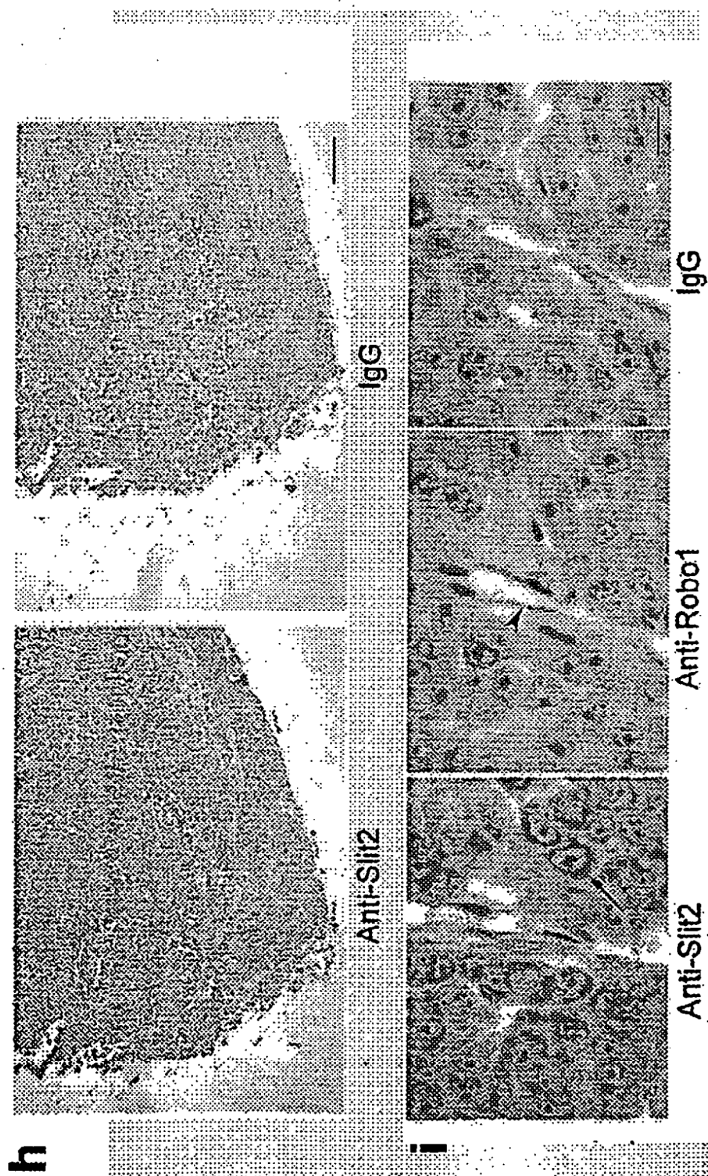
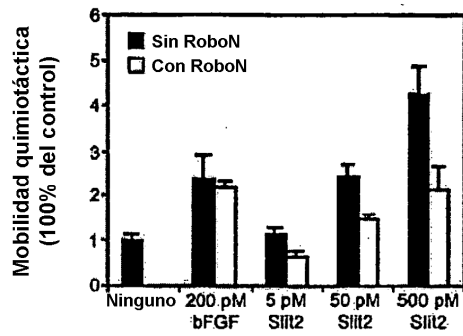
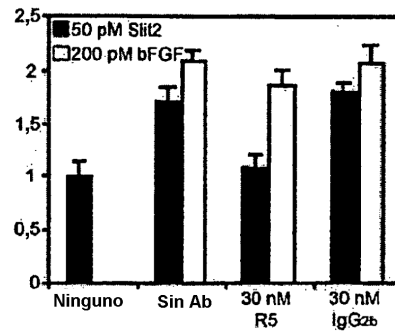


FIGURA 1 h, i

a



b



c

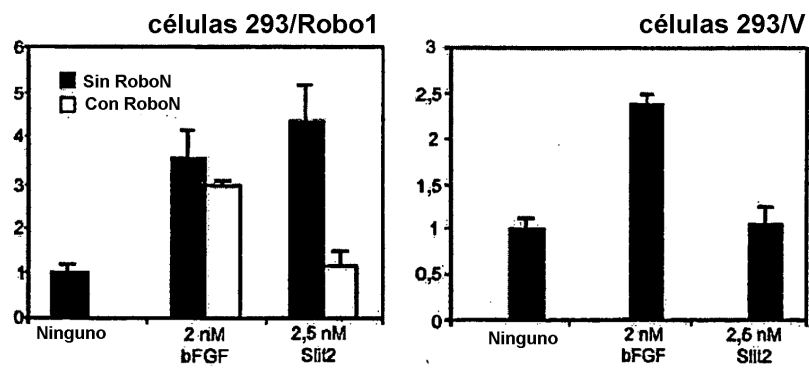


FIGURA 2 a-c

d

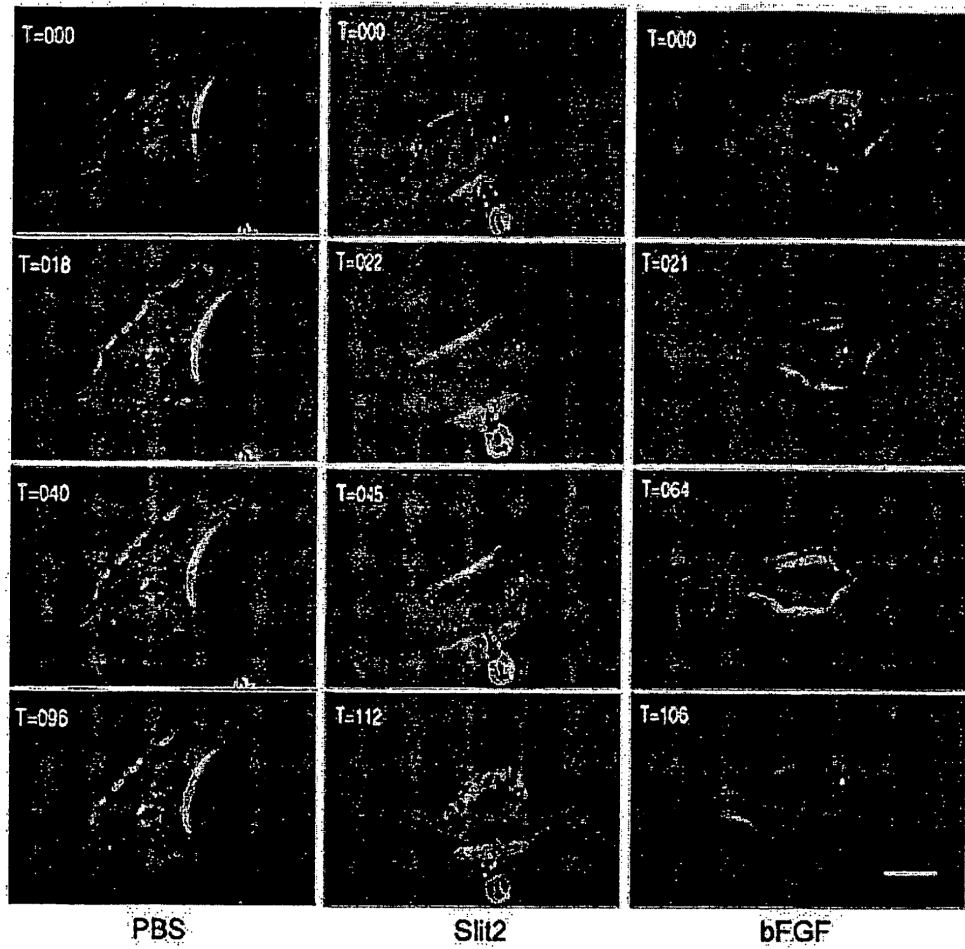


FIGURA 2 d

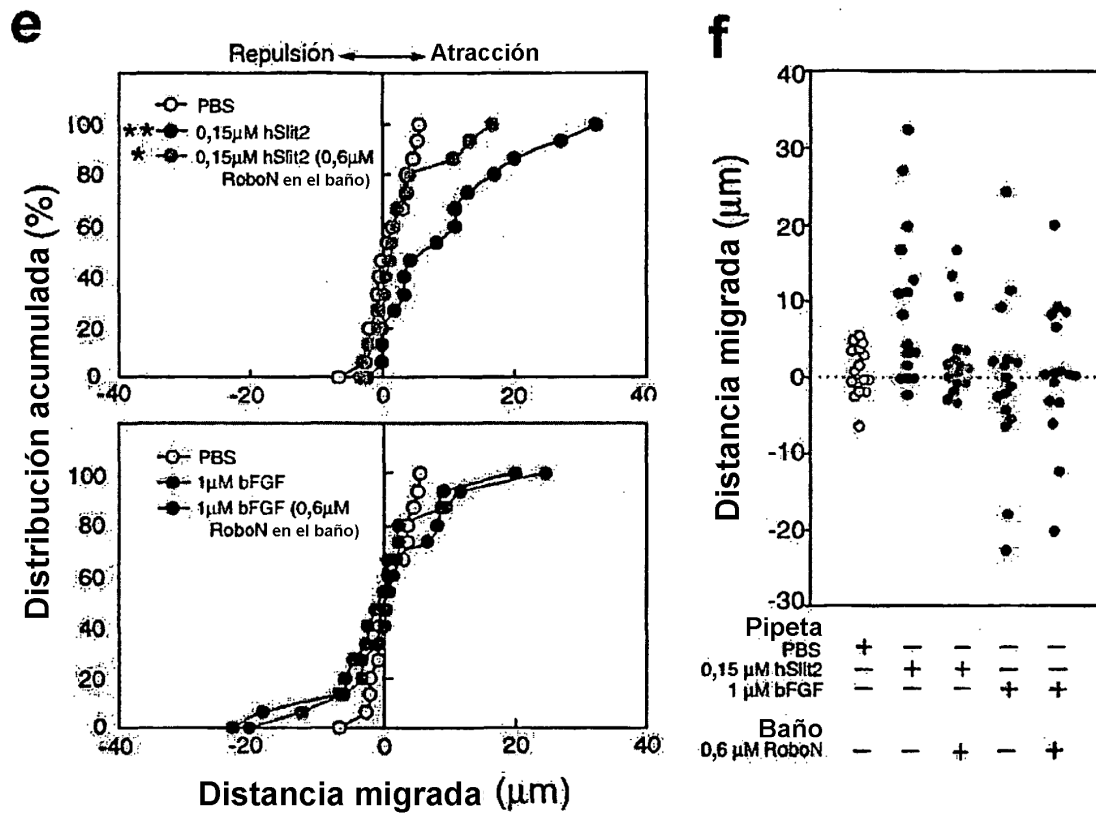
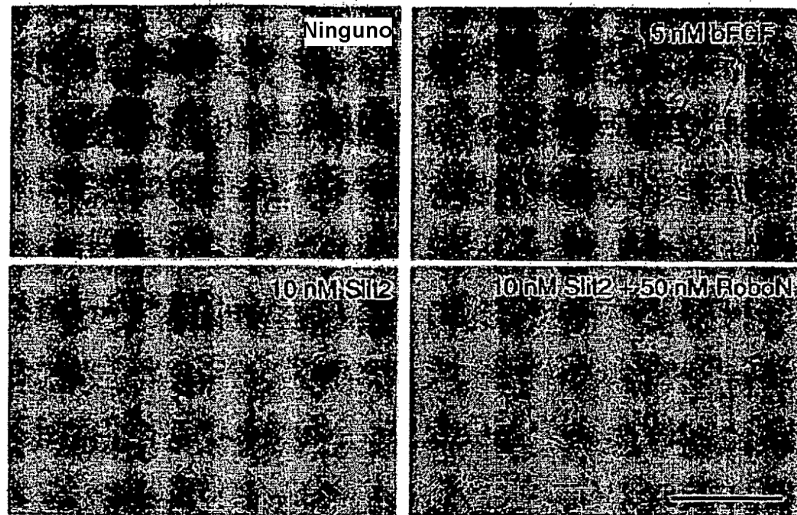
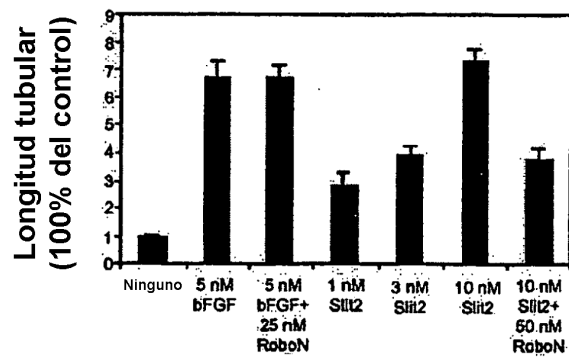


FIGURA 2 e, f

g



h



i

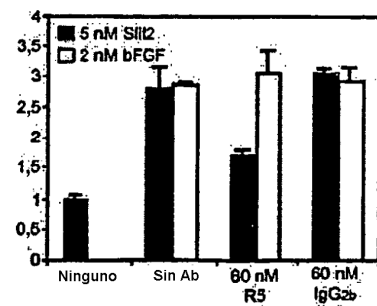


FIGURA 2 g-i

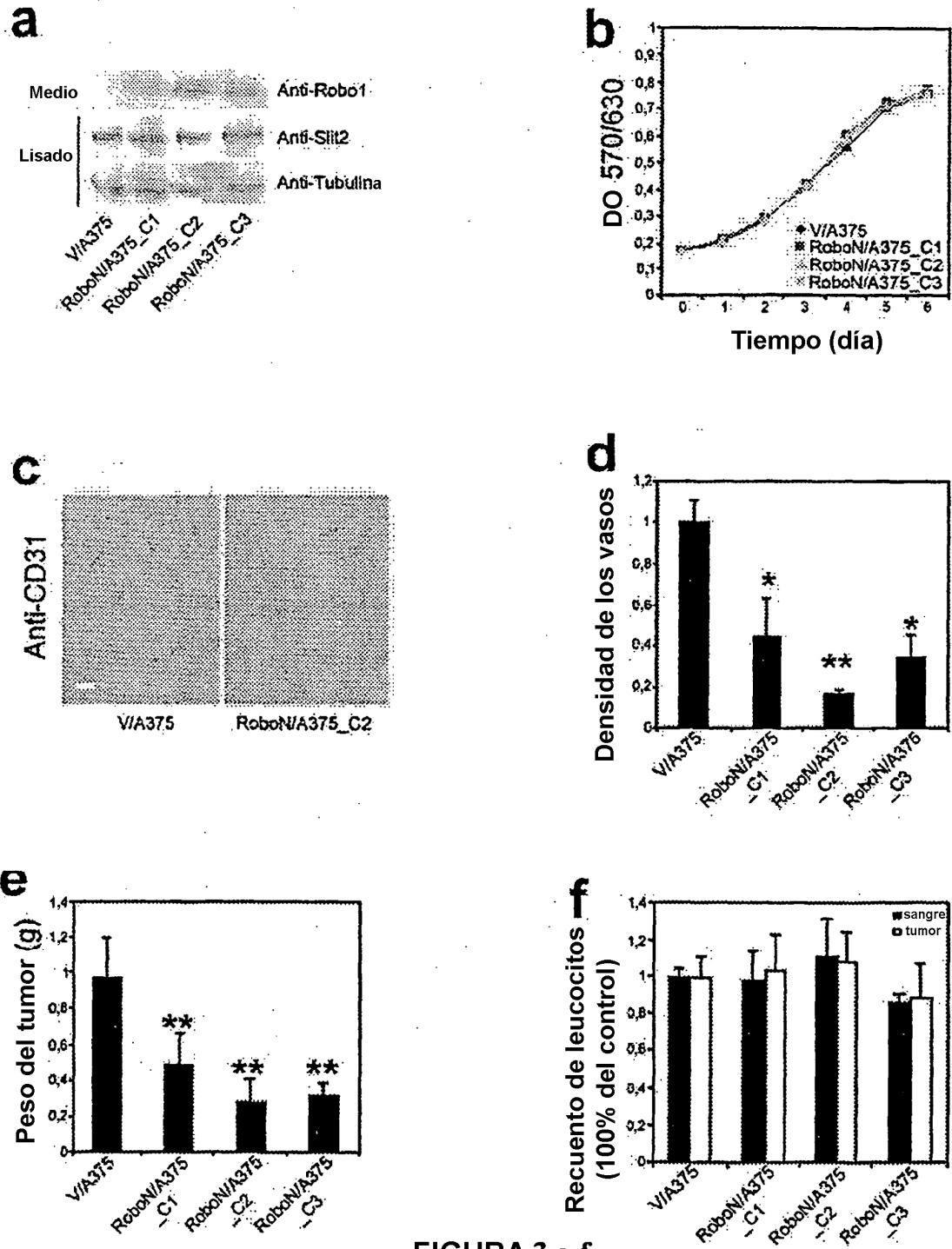


FIGURA 3 a-f

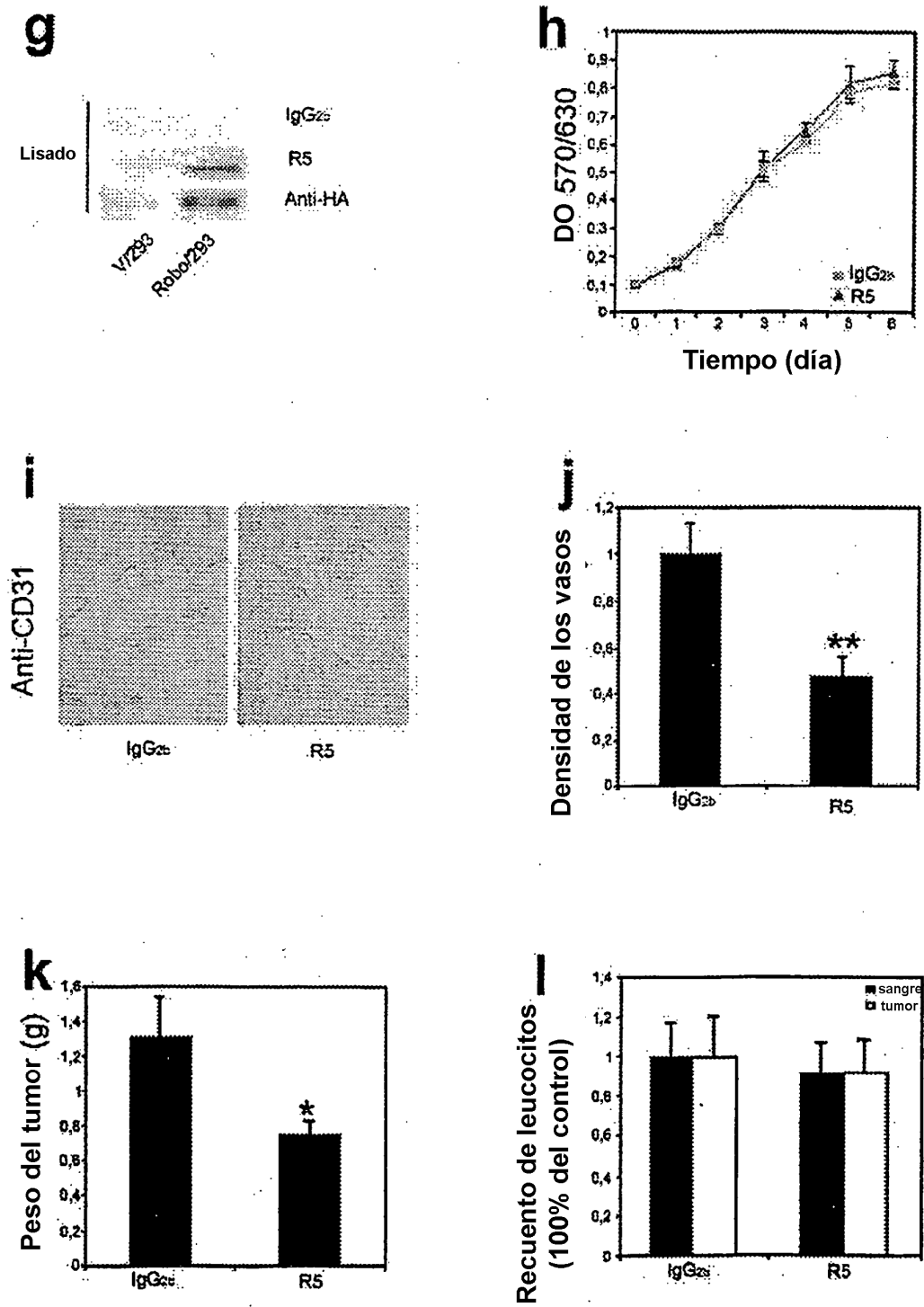


FIGURA 3 g-l

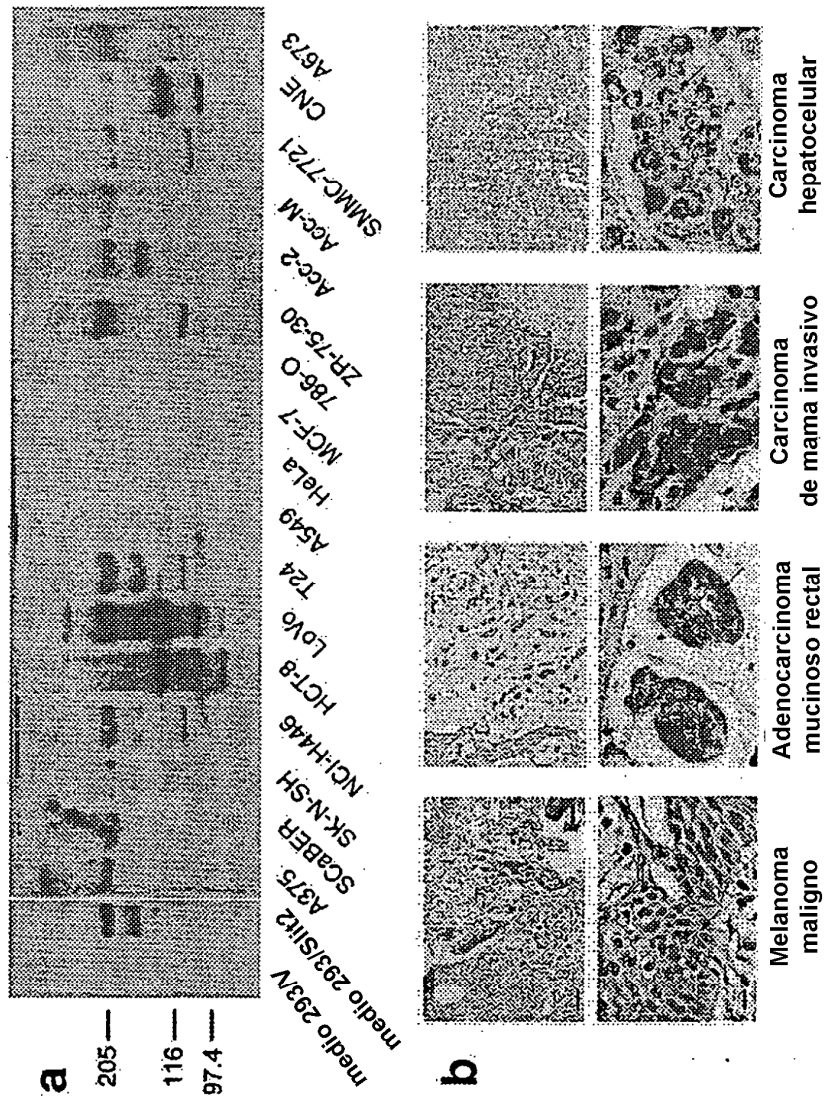


FIGURA 4 a, b

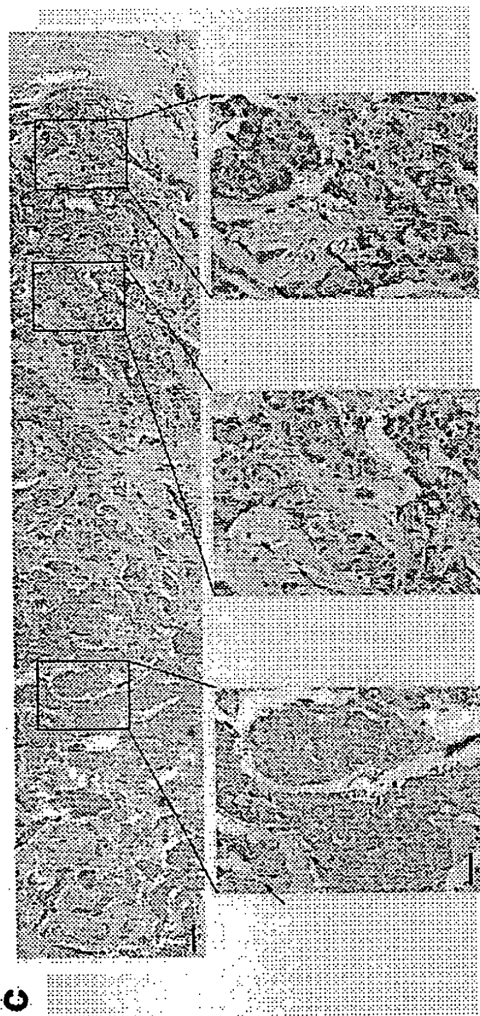


FIGURA 4 c