(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 525 669**

(51) Int. Cl.:

A61K 45/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
A61K 31/56	(2006.01)
A61K 38/43	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 35/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.1999** **E 10181992 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014** **EP 2311495**

(54) Título: **Inhibidores de la vascularización**

(30) Prioridad:

24.03.1998 JP 9544898

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2014

(73) Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku
Tokyo, 115-8543, JP y
KISHIMOTO, TADAMITSU (50.0%)

(72) Inventor/es:

KISHIMOTO, TADAMITSU;
NAGASAWA, TAKASHI y
TACHIBANA, KAZUNOBU

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 525 669 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

Inhibidores de la vascularización

Campo técnico

Esta invención se refiere a una composición farmacéutica novedosa para su uso como un agente antineoplásico, que comprende un inhibidor del CXCR4 como el ingrediente eficaz.

Técnica anterior

En el pasado, se sabía que cuando las células tumorales salen fuera de los vasos sanguíneos, las células endoteliales vasculares se rompen. También se sabe que la neovascularización está profundamente implicada en la proliferación y la migración del cáncer y que las células tumorales producen y liberan una variedad de factores de neovascularización. Especialmente, la neovascularización está considerada como crucial para la proliferación de tumores sólidos.

Por lo tanto, una sustancia que inhiba la neovascularización tiene el potencial de ser un agente anticanceroso que es proporcionado con un nuevo modo de acción. Por esta razón, ya se ha probado el uso de varios tipos de sustancias inhibidoras de la neovascularización tales como esteroides y productos metabólicos de microorganismos. ("Manual for Studies on Cancer Invasion and Metastasis," The Cancer Metastasis Society Ed., Kinhodo Publisher, 159-182 (1994)). Sin embargo, se desea fuertemente descubrir nuevas sustancias inhibidoras de la neovascularización con la acción de inhibir más eficazmente la proliferación y la metástasis de cánceres.

Divulgación de la invención

Esta invención se define en las reivindicaciones.

Específicamente, los autores de la presente invención llevaron a cabo extensas investigaciones con objeto de resolver los problemas identificados anteriormente; y como resultado han descubierto que cuando se crean ratones con genes inactivados que carecen del factor estimulante del crecimiento de células pre-B/factor derivado de células estromales (denominado en lo sucesivo "PBSF/SDF-I" o "SDF-1"), que es una quimiocina de CXC, así como de CXCR4, que es un receptor de quimiocinas, se suprime la vascularización en los ratones y concretamente, la supresión de CXCR4 da como resultado una supresión de la vascularización. Dicho descubrimiento significa que el receptor de quimiocinas CXCR4 es esencial para la neovascularización.

La neovascularización de tejidos vivos se produce generalmente a través de un remodelado del sistema vascular previamente existente cuando crecen para realizar sus funciones específicas durante el desarrollo. Los análisis de los ratones mutantes han determinado que las moléculas requeridas por los sistemas vasculares tempranos son en su mayoría receptores de cinasas de tirosina y sus ligandos. (Risau, W. Nature 386, 671-674 (1997); Folkman, J. & D'Amore, P. A. Cell 87, 1158-1155 (1996); y Lindahl, P. y col., science 277, 242-245 (1997)). Sin embargo, las sustancias responsables de la vascularización durante la organogénesis todavía no han sido identificadas, porque la mayoría de estos ratones muere durante la gestación temprana antes del desarrollo de sus tejidos.

La estructura del receptor de quimiocinas CXCR4 según esta invención ya se conocía. (Bleul, C. C. y col., Nature 382, 829-883 (1996); Oberlin, E. y col., Nature 382, 888-835 (1996); y Nagasawa, T. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93, 14726-14729 (1996)). El CXCR4 es una proteína acoplada a proteína G que abarca siete dominios transmembrana y un receptor de PBSF/SDF-1, que es una quimiocina CXC. Se cree que el factor mencionado anteriormente es responsable de la linfopoyesis de los linfocitos B, de la mielopoyesis en la médula ósea y de la formación del tabique ventricular cardiaco (Nagasawa, T. y col., Nature 382, 685-688 (1996)). El CXCR4 también funciona como un co-receptor para el VIH-1 trófico de los linfocitos T (Feng, Y. y col., Science 272, 872-877 (1996)). Adicionalmente se ha informado de que el CXCR4 se expresa en células endoteliales cultivadas (Volin, M. V. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 46-53 (1998)).

Además, los autores de la presente invención han descubierto que el anteriormente mencionado CXCR4 se expresa en células endoteliales vasculares en desarrollo y que los ratones que carecen del CXCR4 o de su ligando PBSF/SDF-1, muestran una formación defectuosa de los grandes vasos sanguíneos que abastecen el tracto gastrointestinal. Dicho descubrimiento significa que los sistemas de señalización CXCR4 y PBSF/SDF-1 son esenciales para la formación de las arterias y venas medianas que aportan nutrientes al tracto gastrointestinal. Adicionalmente, los autores de la presente invención han descubierto que los ratones que carecen del CXCR4 tienden a morir en el útero, tal como se observa en los ratones que carecen de PGSF/SDF-1. Dicho descubrimiento sugiere que el CXCR4 es el receptor fisiológico primario más crítico de PBSF/SDF-1.

Basándonos en las anteriores observaciones de los autores de la presente invención, se contempla que las sustancias capaces de inhibir la acción debida al CXCR4 puedan inhibir la vascularización y por tanto puedan ser eficaces agentes anticancerosos, dado que la vascularización es esencial para el mantenimiento y la expansión de los tejidos cancerosos.

Asimismo, se contempla que las sustancias capaces de inhibir el CXCR4 podrán ser agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades que implican una neovascularización.

Adicionalmente se contempla que la promoción de la acción debida al CXCR4 acelere la vascularización y por lo tanto pueda ser un remedio para una enfermedad en la que se desea una vascularización.

Más específicamente, como se resumirá a continuación, esta invención proporciona la materia objeto como se define en las reivindicaciones.

Así, esta invención proporciona una composición farmacéutica para su uso como un agente antineoplásico que comprende un inhibidor del CXCR4 como el ingrediente eficaz, en el que dicho inhibidor está seleccionado del grupo según se define en la reivindicación 1.

Debido a que la formación de arterias y venas medianas o grandes es esencial para el mantenimiento y la expansión de un tejido canceroso que supera un cierto tamaño, el inhibidor de la vascularización para el uso de esta invención bloquea el sistema de señalización del CXCR4 o del PBSF/SDF-l, suprimiendo así el mantenimiento y la expansión del tejido canceroso.

El descubrimiento obtenido en esta invención sugiere la posibilidad de que los sistemas de señalización del CXCR4 y del PBSF/SDF-1 contribuyan a la vascularización universal. Por lo tanto, en las enfermedades en las que la principal causa patológica es un tipo de cáncer o de neovascularización en particular, es probable que el CXCR4 o el PBSF/SDF-l esté profundamente implicado en la causa patológica; en este caso, existe la posibilidad de que estas enfermedades puedan ser suprimidas bloqueando el CXCR4 o el PBSF/SDF-1 individual o simultáneamente con otras moléculas.

En la presente memoria descriptiva y dibujos, las abreviaturas de las bases o aminoácidos siguen la comisión sobre nomenclatura bioquímica (Commission on Biochemistry Nomenclatura) de la IUPAC-IUB, o se basan en lo que es habitual en la técnica. A continuación se ilustran sus ejemplos. Cuando se habla de aminoácidos y pueden estar presentes sus isómeros ópticos, aquéllos representan las formas L salvo que se indique lo contrario.

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

A: adenina

T: timina

G: guanina

C: citosina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

G o Gly: glicina

A o Ala: alanina

V o Val: valina

L o Leu: leucina

I o Ile: isoleucina

S o Ser: serina

T o Thr: treonina

C o Cys: cisteína

M o Met: metionina

E o Glu: ácido glutámico

D o Asp: ácido aspártico

K o Lys: lisina

R o Arg: arginina

H o His: histidina

F o Phe: fenilalanina

Y o Tyr: tirosina

W o Trp: triptófano

P o Pro: prolina

N o Asn: asparagina

Q o Gln: glutamina

BSA: albúmina de suero bovino

FBS: suero bovino fetal

PBS: disolución salina tamponada con fosfato

SDS: dodecilsulfato sódico

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra una estrategia de marcaje para el gen del CXCR4. En la figura se muestran el alelo natural de CXCR4 en la parte superior, un vector de marcaje en el centro y un alelo mutante predicho en la parte inferior. Las regiones codificantes de los genes están indicadas en recuadros negros. Los recuadros vacíos indican las regiones no traducidas 5' y 3'. Las líneas punteadas indican fragmentos homólogos usados en el vector de marcaje. La sonda A es una sonda externa para la hibridación Southern. Los sitios de restricción son E (EcoRI), Sh (SphI) y X (XhoI), respectivamente.

La Fig. 2A es una fotografía que muestra el análisis por inmunotransferencia Southern de colas de ADN de ratones de tipo natural (+/+) y mutantes heterocigotos (+/-). En la figura se muestran los fragmentos EcoRI-EcoRI del alelo de 11,8-kb de tipo natural y del de 8,2-kb de marcaje que fueron identificados por la sonda A.

La Fig. 2B es una fotografía que muestra el análisis de amplificación mediante RT-PCR de la expresión del CXCR4. Se prepararon ARN totales a partir de embriones mutantes de E18.5 de tipo natural y homocigotos y se amplificaron con cebadores específicos para CXCR4. La amplificación mediante RT-PCR empleo ARNm de G3PDH, que era expresado universalmente, como control de la presencia de cualquier ARN amplificable.

La Fig. 3 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales del mesenterio y de la región del asa intestinal media de un embrión de tipo natural para $CXCR4^{-/-}$ en E13.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino con un anticuerpo anti-PECAM-1. La flecha indica una gran ramificación de la arteria mesentérica superior o de la vena mesentérica superior que abastece al intestino delgado en el mesenterio del tipo natural. “du” representa duodeno; "p," la parte proximal del asa intestinal media; y "dm," la parte distal del asa intestinal media.

La Fig. 4 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en los cortes transversales del mesenterio del embrión de tipo natural $CXCR4^{-/-}$ en E13.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino con el anticuerpo anti-PECAM-1. "a" representa arteria y "v" vena.

La Fig. 5 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en el yeyuno de un embrión de tipo natural $CXCR4^{-/-}$ en E17.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino con el anticuerpo anti-PECAM-1. La flecha indica una gran ramificación de la arteria mesentérica superior o de la vena mesentérica superior que abastece al intestino delgado en el mesenterio de tipo natural.

La Fig. 6 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en la parte más distal del yeyuno del embrión de tipo natural $CXCR4^{-/-}$ en E17.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino con el anticuerpo anti-PECAM-1. La flecha indica una gran ramificación de la arteria mesentérica superior o de la vena mesentérica superior que abastece al intestino delgado en el mesenterio de tipo natural.

La Fig. 7 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en el mesenterio y en las regiones del asa intestinal media de un embrión mutante $CXCR4^{-/-}$ en E13.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino del mutante con el anticuerpo anti-PECAM-1. "p" representa la parte proximal del asa intestinal media; y "dm" la parte distal del asa intestinal media.

La Fig. 8 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en los cortes transversales del mesenterio del embrión mutante $CXCR4^{-/-}$ en E13.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino del mutante con el anticuerpo anti-PECAM-I.

La Fig. 9 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en el yeyuno de

un embrión mutante CXCR4$^{-/-}$ en E17.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino del mutante con el anticuerpo anti-PECAM-1.

La Fig. 10 es una fotografía que muestra los defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales en la parte más distal del yeyuno del embrión mutante CXCR4$^{-/-}$ en 17.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino del mutante con el anticuerpo anti-PECAM-1.

La Fig. 11 es una fotografía que muestra defectos en los vasos sanguíneos gastrointestinales, que son una lesión hemorrágica del intestino sin teñir de un ratón mutante, un embrión CXCR4$^{-/-}$ mutante E16.5, resultante de la inmunohistotinción del mesenterio y el intestino del mutante con el anticuerpo anti-PECAM-1.

La Fig. 12A es una fotografía que muestra el resultado de la inmunohistotinción del estómago de un E13.5 de tipo natural con el anticuerpo anti-PECAM-1. La flecha indica un gran vaso observado solo en el tipo natural.

La Fig. 12B es una fotografía que muestra el resultado de la inmunohistotinción del estómago de un E13.5 mutante con el anticuerpo anti-PECAM-1.

La Fig. 12C es una fotografía que muestra el resultado de la inmunohistotinción del estómago de un E15.5 de tipo natural con el anticuerpo anti-PECAM-1. El inserto de la fotografía muestra cortes teñidos con hematoxilina y eosina de grandes vasos en la pared del estómago teñido en E15.5. La flecha indica un gran vaso observado solo en el tipo natural.

La Fig. 12D es una fotografía que muestra el resultado de la inmunohistotinción del estómago de un E15.5 mutante con el anticuerpo anti-PECAM-1.

La Fig. 13A es una fotografía que muestra la expresión de CXCR4 y PBSF/SDF-1 en un tejido del tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. Los cortes sucesivos del mesenterio de tipo natural que conecta con el asa intestinal media se tiñeron con hematoxilina y eosina. "m" representa mesenterio, "i" intestino, "a" arteria mesentérica superior y "v" vena mesentérica superior.

La Fig. 13B es una fotografía que muestra la expresión de CXCR4 y PBSF/SDF-1 en un tejido del tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. La hibridación se realizó con una sonda específica para CXCR4. Las flechas indican las células endoteliales teñidas de los vasos mesentéricos.

La Fig. 13C es una fotografía que muestra la expresión de CXCR4 y PBSF/SDF-1 en un tejido del tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. La hibridación se realizó con una sonda específica para PBSF/SDF-1. El PBSF/SDF-1 era expresado en las células mesenquimatosas que rodean a las células endoteliales en el mesenterio.

La Fig. 13D es una fotografía que muestra la expresión de CXCR4 y PBSF/SDF-1 en un tejido del tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. Los cortes sucesivos del mesenterio de tipo natural que conecta con el asa intestinal media se tiñeron con hematoxilina y eosina. La Fig. 13D es una ampliación de los vasos sanguíneos que surgen desde la arteria mesentérica superior mostrada en la Fig. 13A, en la que se observó una fuerte expresión del CXCR4 en las células endoteliales vasculares.

La Fig. 13E es una fotografía que muestra la expresión de CXCR4 y PBSF/SDF-1 en un tejido del tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. La hibridación se realizó con la sonda específica para CXCR4-. La Fig. 13E es una ampliación de los vasos sanguíneos que surgen desde la arteria mesentérica superior mostrada en la Fig. 13B, en la que se observó una fuerte expresión del CXCR4 en las células endoteliales vasculares. La flecha indica las células endoteliales teñidas de los vasos mesentéricos.

La Fig. 13F es una fotografía que muestra la expresión de CXCR4 y PBSF/SDF-1 en un tejido del tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. Es una sección de una médula ósea embrionaria de un E18.5 de tipo natural, que muestra la expresión del CXCR4 en células hematopoyéticas, pero ninguna expresión en células estromales fusiformes.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La composición farmacéutica para su uso como el agente antineoplásico según esta invención comprende como ingrediente eficaz una sustancia que inhibe la acción del CXCR4 como se define en la reivindicación 1 que es un receptor de quimiocinas.

La secuencia de aminoácidos del CXCR4 ya se conocía. Específicamente, la secuencia de aminoácidos del CXCR4 humano y la secuencia de aminoácidos del CXCR4 murino se establecen en las SEC ID N.^{os}: 1 y 3, respectivamente. La secuencia de bases del CXCR4 humano y la secuencia de bases del CXCR4 murino se establecen en la SEC ID N.º: 2 (posiciones de bases 1-1056) y en la SEC ID N.º: 4 (posiciones de bases 1-1077), respectivamente.

También, se conocía ya la secuencia de aminoácidos del SDF-1, que es un ligando que se une al CXCR4. Existen dos tipos de SDF-1 que difieren en la longitud de la secuencia de aminoácidos, es decir, SDF-1-α y SDF-1-β.

Específicamente, la secuencia de aminoácidos del SDF-1-α humano se establece en la SEC ID N.º: 5 y su secuencia de bases en la SEC ID N.º: 6 (posiciones de base 474-740). El SDF-1-β humano (SEC ID N.º: 9) deriva del SDF-1-α humano mediante la adición de cuatro restos de aminoácidos, Arg Phe Lys Met, a un C-terminal del mismo.

La secuencia de aminoácidos del SDF-1-α murino se establece en la SEC ID N.º: 7 y su secuencia de bases en la SEC ID N.º: 8 (posiciones de base 82-348). El SDF-1-β murino (SEC ID N.º: 10) deriva del SDF-1-α murino mediante la adición de cuatro restos de aminoácidos, Arg Leu Lys Met, a un C-terminal del mismo. Para los SDF-l humano y murino, la secuencia de desde el primer aminoácido (Met) hasta el vigésimo primer aminoácido (Gly) es una secuencia señal.

Las quimiocinas CXC conocidas hasta ahora incluían, además del PBSF/SDF-1 mencionado anteriormente, IL-8 (Yoshimura., T. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 84, 9233-9237 (1987)), NAP-2 (Walz. A. y col., Biochem. Biophys. Res. Comun., 159, 969-975 (1989)), NAP-4, GRO α (Richmondo, A. y col., J. Cell. Biochem., 36, 185-198 (1988)), GRO β (Haskill, S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87, 77732-7736 (1990)), GRO γ (Haskill, S. y col., *ibid*. (1990)), GCP-2 (Proost, P. y col., J. Immunol., 150, 1000-1010 (1993)), ENA-78 (Wayz, A. y col., J. Exp. Med., 174, 1355-1362 (1991)), PF-4 (Deuel, T. F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 74, 2256-2258 (1977)) e IP-10 (Dewald, B. y col., Immunol. Lett., 32, 81-84 (1992)).

Las sustancias que inhiben la acción debida al CXCR4 que se pueden usar en esta invención son: (1) una sustancia basada en la inhibición de la propia unión entre el ligando (SDF-1) y el receptor (CXCR4); (2) una sustancia basada en la inhibición de la señalización desde el CXCR4 hacia los núcleos; (3) una sustancia que inhibe la expresión del propio CXCR4; y (4) una sustancia que inhibe la expresión del propio SDF-1, según se define adicionalmente en la reivindicación 1.

(1) Para la sustancia que inhibe la propia unión entre el SDF-1 y el CXCR4, hay una sustancia que inhibe el SDF-1 y una sustancia que inhibe el CXCR4.

Más específicamente, la sustancia que inhibe el SDF-1 se clasifica en una sustancia que inhibe el CXCR4 en competición antagonista con el SDF-1 y una sustancia que inhibe la unión del SDF-1 al CXCR4 uniéndose al SDF-1.

Para la sustancia que inhibe la unión del SDF-1 al CXCR4 uniéndose al SDF-1, concretamente se menciona un anticuerpo anti-SDF-1 y un fragmento del mismo que posee una actividad de unión.

Más específicamente, la sustancia que inhibe el CXCR4 se clasifica en una sustancia que inhibe el CXCR4 en competición antagonista con el CXCR4 por la unión al SDF-1 y una sustancia que inhibe la unión del SDF-1 al CXCR4 uniéndose al CXCR4.

Para la sustancia que inhibe la unión del SDF-1 al CXCR4 uniéndose al CXCR4, concretamente se menciona un anticuerpo anti-CXCR4 y un fragmento del mismo que posee su actividad de unión.

(2) La limitación para la sustancia basada en la inhibición de la señalización desde el CXCR4 hacia los núcleos se define en la reivindicación 1, siempre que sea una sustancia que tenga dicha acción. Para la sustancia basada en la inhibición de la señalización desde el CXCR4 hacia los núcleos, se mencionan inhibidores del sistema de señalización que existen posteriores a una proteína acoplada a proteína G, tal como un inhibidor de la cascada MAK, un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC) y un inhibidor de cinasa para la cinasa PI3.

(3) Para la sustancia que inhibe la expresión del propio CXCR4, se menciona una sustancia que aparentemente hace desaparecer el CXCR4 en células y una sustancia que inhibe la expresión del propio CXCR4. Un ejemplo específico de la sustancia que aparentemente hace desaparecer el CXCR4 en células es una sustancia que induce regulación a la baja del CXCR4. La “inducción de regulación a la baja del CXCR4” significa específicamente una función tal que actúa en la membrana celular para alterar la movilidad de la misma y de este modo hacer desaparecer el CDCR4 de la membrana celular.

(4) Para la sustancia que inhibe la expresión del propio SDF-1 frente al CXCR4, se menciona una sustancia que inhibe el sitio de control de la expresión, tal como un promotor.

Los anticuerpos descritos anteriormente que pueden usarse en esta invención, tales como los anticuerpos anti-SDF-1 y los anticuerpos anti-CXCR4, pueden prepararse como anticuerpos policlonales o monoclonales usando técnicas que se conocen en la materia. Especialmente, se prefieren los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos como los anticuerpos que se usan en la invención. Los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen aquellos producidos por hibridomas y aquellos producidos por los huéspedes que han sido transformados con vectores de expresión que contienen los genes del anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética. Estos anticuerpos son aquellos que poseen las propiedades mencionadas anteriormente.

Los hibridomas productores de anticuerpos pueden prepararse principalmente usando técnicas conocidas en la materia de la siguiente forma. Es decir, se usa un antígeno deseado como el antígeno sensibilizante para llevar a cabo la inmunización según un procedimiento de inmunización convencional; y las células inmunizadas resultantes se fusionan con células parentales conocidas en la técnica mediante un procedimiento de fusión celular convencional y las células

productoras de anticuerpos monoclonales se someten a una clonación mediante un procedimiento de clonación convencional.

Los mamíferos que se van a inmunizar con el antígeno sensibilizante no están particularmente limitados, pero deberían seleccionarse preferiblemente teniendo en cuenta su compatibilidad con las células parentales que se van a usar en la fusión celular. Generalmente se usan animales pertenecientes a la familia de los roedores, tales como ratones, ratas y hámsteres. La inmunización de los animales con el antígeno sensibilizante se lleva a cabo mediante un procedimiento conocido en la técnica.

Para las células de mieloma de mamífero usadas como las otras células parentales para la fusión con los immunocitos, puede emplearse apropiadamente una variedad de líneas celulares ya conocidas en la materia. La fusión celular entre los immunocitos y las células de mieloma puede llevarse a cabo básicamente según un procedimiento convencional, tal como el procedimiento de Milstein y col. (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol., 73, 3-46 (1981)) con cualquier modificación posible.

Los hibridomas obtenidos se eligen cultivando en un medio de selección común, tal como medio HAT (un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en el medio HAT continúa durante un tiempo suficiente para permitir la destrucción de todas las células diferentes a los hibridomas objetivo (las células no fusionadas), que es habitualmente desde unos pocos días hasta unas pocas semanas. Entonces se realiza el procedimiento de dilución limitante habitual para cribar y clonar los hibridomas productores de los anticuerpos objetivo. Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de los hibridomas así obtenidos siguiendo un procedimiento que se emplea habitualmente.

Además de la adquisición de los hibridomas mediante la inmunización de un animal distinto a un ser humano con el antígeno según se describió anteriormente, los linfocitos humanos son sensibilizados *in vitro* con una proteína de antígeno o una célula que expresa el antígeno deseadas y los linfocitos B sensibilizados se fusionan con las células de mieloma humano, tales como U266, mediante lo que pueden obtenerse los anticuerpos humanizados deseados que poseen la actividad de unión hacia el antígeno o la célula que expresa el antígeno deseados. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados deseados pueden obtenerse según el procedimiento mencionado anteriormente administrando el antígeno o la célula que expresa el antígeno a un animal transgénico con un repertorio de genes de anticuerpos humanos.

Se clona un gen del antígeno como un anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma y se incorpora en un vector adecuado; y este se introduce en un hospedador y se usa la tecnología de manipulación génica para producir un anticuerpo recombinante, que puede ser usado entonces en esta invención. Véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrenbaeck, James, W. Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado en el Reino Unido por Macmillan Publishers Ltd. 1990.

En esta invención pueden usarse los anticuerpos recombinantes que han sido modificados artificialmente con el propósito de reducir la antigenicidad heterogénea frente al ser humano, tales como anticuerpos quiméricos (publicación de patente europea EP125023) y anticuerpos humanizados (publicación de patente europea EP125023). Estos anticuerpos pueden producirse mediante procedimientos conocidos.

El anticuerpo quimérico comprende la región variable de un anticuerpo procedente de un mamífero distinto a un ser humano y la región constante (región C) procedente de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado comprende una región determinante de la complementariedad de un anticuerpo procedente de un mamífero distinto a un ser humano, una región marco (FR) procedente de un anticuerpo humano y una región C. Son útiles como los ingredientes eficaces en esta invención debido a la antigenicidad disminuida en el cuerpo humano.

Los anticuerpos usados en esta invención pueden ser fragmentos de un anticuerpo o sustancias modificadas del mismo, siempre que puedan usarse de forma deseable en la invención. Los fragmentos del anticuerpo incluyen, por ejemplo Fab, $F(ab')_2$, Fv y una cadena simple Fv (scFv) obtenible mediante la conexión del Fv de la cadena H y el Fv de la cadena L mediante un conector adecuado. Específicamente, se trata un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina, para producir fragmentos del anticuerpo. Alternativamente se construyen genes que codifican para estos fragmentos de anticuerpo y se introducen en un vector de expresión, tras lo que se expresan en células huésped adecuadas.

Puede utilizarse el procedimiento de la biblioteca de fagos para obtener los anticuerpos que se usan en esta invención. (Marks, C. y col., The New England Journal Medicine 335, 730-733). Por ejemplo, se obtiene una biblioteca de ADNc a partir de linfocitos B humanos que comprende una región V de un anticuerpo humano, tal como el gen que codifica para el scFv. Esta biblioteca de ADNc se introduce en un vector fago, tal como el vector presentador de superficie del fago M13 y se deja que infecte a *E. coli.* La biblioteca de ADNc es expresada en *E. coli* y la región V del anticuerpo es producida en las superficies de la célula. Si se realiza una selección en una placa recubierta con el antígeno deseado basada en la actividad de unión del antígeno, puede obtenerse un gen que codifique para el anticuerpo deseado.

Pueden obtenerse anticuerpos que posean una actividad de unión más fuerte a los antígenos mediante el procedimiento de intercambio de cadenas con la aplicación del procedimiento de la biblioteca de fagos. (Akamatsu, Y. y Tsurushita, N. Medical Immunology 27, 273-286 (1994)). Específicamente, se fija un miembro de la región V de un gen de un anticuerpo que ha sido separado (tal como VH); y se construye una nueva biblioteca a partir de la mezcla del primer miembro y del otro miembro preparada a partir de linfocitos B (tal como VL). Los clones que se unen al antígeno más fuertemente que

los demás pueden ser separados de la biblioteca.

También es posible obtener anticuerpos que posean una actividad de unión más fuerte a los antígenos introduciendo mutaciones artificiales en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. (Akamatsu, Y. y Tsurushita, N. Medical Immunology 27, 273-286 (1994)).

Más específicamente, la mutación es introducida en un gen que codifica para la región V del anticuerpo clonado y este gen es expresado mediante el procedimiento de la biblioteca de fagos descrito anteriormente. Como consecuencia, resulta posible obtener un gen que codifica para el anticuerpo que posee una actividad de unión más fuerte al antígeno.

Estos fragmentos de anticuerpo pueden ser producidos por hospedadores después de que sus genes sean obtenidos y expresados de la misma forma a la descrita previamente, anteriormente. Según se usa en la presente memoria descriptiva, "anticuerpo" engloba estos fragmentos de anticuerpo.

Las formas modificadas de anticuerpo pueden emplear anticuerpos que estén unidos a diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). Según se usa en la presente memoria descriptiva, el "anticuerpo" engloba estas formas modificadas de anticuerpo. La obtención de estas formas modificadas de anticuerpo puede realizarse sometiendo los anticuerpos obtenidos a una modificación química. Estos procedimientos ya han sido establecidos en la técnica.

Los anticuerpos que se expresan y producen según se describió anteriormente pueden separarse de las células huésped intracelular o extracelularmente y pueden purificarse hasta la homogeneidad según los procedimientos que se usan habitualmente. La medida de la concentración puede llevarse a cabo mediante la medida de la absorbancia, ELISA o similares.

Según se explicó anteriormente, el uso del inhibidor de la vascularización según esta invención comprende el inhibidor del CXCR4 como el ingrediente eficaz que permite la inhibición de la vascularización; por lo tanto, ejercerá un efecto antitumoral (inhibición de la neovascularización) sobre cánceres sólidos, además de efectos antitumorales sobre el angiosarcoma (cáncer de los propios vasos sanguíneos) y el sarcoma de Kaposi. En aspectos de referencia también ejercerá efectos terapéuticos contra enfermedades causadas patológicamente por una neovascularización, tales como artritis reumatoide, psoriasis y retinopatía diabética.

Si se usa el agente terapéutico que comprende la sustancia que potencia la acción del CXCR4 para una enfermedad causada patológicamente por neovascularización, será posible promover la neovascularización. El uso ejercerá efectos terapéuticos sobre el infarto de miocardio y enfermedades que implican una neovascularización tras una cirugía, tales como la cicatrización de heridas, la reparación y el remodelado de huesos, la reparación del cartílago, el crecimiento del pelo, el infarto de miocardio, el infarto cerebral y el traumatismo cerebral.

Para los procedimientos de prueba de inhibición y promoción de la neovascularización que pueden usarse en esta invención puede emplearse un ensayo de neovascularización. No hay ninguna limitación en particular para este ensayo y puede usarse preferiblemente un procedimiento que es habitualmente conocido. ("Research Manual for the Invasion and Metastasis of Cancers" the Cancer Metastasis Study Group Ed., Kinhodo, 159-182, (1994)). Específicamente se mencionan, entre otros, (I) el procedimiento para medir la segmentación de los espacios entre las células endoteliales vasculares (es decir, el efecto sobre las células endoteliales vasculares), que se basa en el descubrimiento de que las células endoteliales vasculares se rompen cuando las células tumorales salen fuera de los vasos sanguíneos (a partir de la permeabilidad del FITC dextrano); (II) el procedimiento de la cornea, conocido como un procedimiento de medición *in vivo* para identificar un factor candidato que ejerza la función de un factor inductor de la neovascularización *in vivo*; (IV) el procedimiento CAM (membrana corioalantoidea de embrión de pollo); (V) el procedimiento de la subcutánea dorsal para medir la cantidad de vasos sanguíneos inducidos a simple vista; y (VI) el procedimiento para determinar la formación de lumen por parte de las células endoteliales vasculares.

Para confirmar el efecto antitumoral, pueden mencionarse experimentos *in vivo* usando un modelo de transplante o un modelo de metástasis de transplante y experimentos *in vitro* con células cancerosas. Específicamente, puede usarse el procedimiento descrito en "Research Manual for the Invasion and Metastasis of Cancers" the Cancer Metastasis Study Group Ed., Kinhodo, 7-158 (1994).

La composición farmacéutica para su uso como el agente antineoplásico según esta invención puede administrarse sistémicamente (por vía oral) o localmente. Por ejemplo, puede elegirse una inyección intravenosa (tal como una infusión intravenosa por goteo), una inyección intramuscular, una inyección intraperitoneal o una inyección subcutánea: puede elegirse un procedimiento de administración adecuado dependiendo de la edad o la gravedad del sujeto.

La dosis unitaria eficaz se elige en el intervalo de de 0,09 mg hasta 100 mg por kg de peso corporal.

Alternativamente, puede elegirse una dosis de 1-1000 mg, preferiblemente una dosis de 5-50 mg para el sujeto.

La composición farmacéutica para su uso como el agente antineoplásico según esta invención puede contener conjuntamente vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables, dependiendo de la vía de administración. Algunos ejemplos de dichos vehículos y aditivos incluyen agua, disolventes orgánicos que sean farmacéuticamente aceptables,

colágeno, alcohol polivinílico, polivinilopirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato sódico, arginato sódico, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metilcelulosa, goma xantana, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, tensioactivos que sean aceptados como aditivos para fármacos, etc.

Los aditivos que se van a usar pueden seleccionarse apropiadamente (o en combinación) entre aquellos mencionados anteriormente dependiendo de la forma de dosificación, pero no se limitan a los mismos.

Esta invención se ilustrará a continuación con mayor detalle mediante ejemplos.

Ejemplos

Creación y análisis de ratones que carecen completamente de CXCR4

Se aisló un ADN genómico que contenía el locus del CXCR4 a partir de una biblioteca de ADN de la línea celular murina 129 (STRATAGENE).

Se sustituyó un fragmento genómico de 1,1 kb que contenía la región codificante 5' del exón 2 por un gen resistente a la neomicina y se ligó el gen de la cinasa de timidina del herpes simple al 5' terminal.

El vector marcador se introdujo en las células el día 14.1 de la embriogénesis (denominado en lo sucesivo "E14.1") mediante electroporación y se seleccionó una recombinación homóloga usando G418 y ganciclovir y se identificó mediante PCR.

La estructura del locus mutante y la presencia de un único inserto en la colonia de células ES fueron confirmadas mediante una hibridación Southern. Según el procedimiento descrito en Nagasawa, T. y col., Nature 382, 685-688 (1996), se usó la colonia de células ES mutantes para crear un ratón mutante mediante la inyección de células embrionarias no diferenciadas.

Mediante hibridación Southern se digirió la cola de ADN con EcoRI, se transfirió a una membrana de nailon y se hibridó con una sonda A de 550 pb con la región 5' homóloga.

Se realizó una RT-PCR durante 40 ciclos, usando 3 μg del ARN total aislado del hígado fetal de los embriones E18.5 como material de partida, según el procedimiento convencional. Se amplificó un producto de PCR de 630 pb usando cebadores específicos para CXCR4, es decir, un cebador directo (SEC ID N.º: 11) y un cebador inverso (SEC ID N.º: 12). Se llevaron a cabo un análisis histológico y un análisis por citometría de flujo, sustancialmente según el procedimiento descrito en Nagasawa, T. y col., Nature 382, 685-688 (1996).

La inmunohistotinción siguió sustancialmente el procedimiento de Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H. Nishikawa, S.-I. Int. Immunol. 9, 507-514. Las secciones de los embriones y órganos se fijaron con paraformaldehído al 4%, se deshidrataron con metanol, se decoloraron con peróxido de hidrógeno al 30% en metanol y se hidrataron de nuevo.

Después de incubar en PBSMT (PBS que contiene leche en polvo desnatada al 1% y un 0,3% v/v de Triton X-100), la muestra se incubó con anticuerpo anti-PECAM diluido (1:250) (PharMingen) en PBSMT a 4°C hasta el día siguiente. Entonces la muestra se lavó con PBSMT y se incubó con anticuerpo Ig anti-rata marcado con peroxidasa de rábano diluido (1:500) (Biosource) en PBST a 4°C durante toda la noche.

A continuación la muestra se lavó exhaustivamente. El embrión se incubó en PBS que contenía 250 μg/ml de diaminobencidina (Dojin Chemicals) y $NiCl_2$ al 0,08% durante 30 min. Se añadió peróxido de hidrógeno a la muestra para proporcionar una concentración final del 0,01%, tras lo que se llevó a cabo la tinción con peroxidasa. La reacción se inactivó después de aproximadamente 30 min.

Según el procedimiento descrito en Nagasawa, T. y col., Nature 382, 685-688 (1996), se usó un fragmento de ADNc de CXCR4 o de PBSF/SDF-1 murino como sonda para llevar a cabo la transcripción antisentido.

Se crearon ratones carentes de CXCR4 para determinar la función fisiológica del CXCR4. Específicamente se construyó un vector marcador, de forma que la mayoría del exón 2 del gen de CXCR4 que contenía todas las regiones transmembranales críticas para la función del receptor había sido delecionada y la porción delecionada sería sustituida por un gen de resistencia a la neomicina (neo). Esto daría como resultado que, tras una recombinación homóloga, todo el gen del CXCR4 había sido sustancialmente delecionado.

La Fig. 1 es un gráfico que muestra una estrategia de marcaje para el gen del CXCR4 (denotado como superior, central e inferior). Se muestran el alelo natural de CXCR4 en la parte superior, un vector marcador en el centro y un alelo mutante predicho en la parte inferior. Las regiones codificantes de los genes están indicadas mediante recuadros negros. Los recuadros vacíos indican las regiones 5' y 3' no traducidas. Las líneas de puntos indican fragmentos homólogos usados en el vector marcador. La sonda A es una sonda externa para la hibridación Southern. Aquí, los sitios de restricción son E (EcoRI), Sh (SphI) y X (XhoI), respectivamente.

La Fig. 2A es una fotografía que muestra el análisis por inmunotransferencia Southern de las colas de ADN de ratones de tipo natural (+/+) y heterocigotos mutantes (+/-). En la figura se muestran los fragmentos EcoRI-EcoRI del alelo de tipo natural de 11,8 kb y marcado de 8,2 kb que fueron identificados mediante la sonda A. La Fig. 2B es una fotografía que muestra el análisis de amplificación mediante RT-PCR de la expresión del CXCR4. Se prepararon ARN totales a partir de embriones naturales E18.5 y homocigotos mutantes y se amplificaron con cebadores específicos para CXCR4. La amplificación mediante RT-PCR empleó ARNm G3PDH, que se expresaba universalmente, como control de la presencia de cualquier ARN amplificable.

Se crearon ratones con una mutación heterocigota $CXCR4^{+/-}$. Los ratones estaban sanos y eran fértiles. Los embriones homocigotos mutantes CXCR44 están presentes en las proporciones esperadas hasta E15.5 de la embriogénesis. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los embriones $CXCR4^{-/-}$ murieron en E18.5 y los neonatos $CXCR4^{-/-}$ murieron en una hora, de forma similar a los ratones que carecían de PBSF/SDF-1, según se informó previamente (Nagasawa, T. y col., Nature 382, 685-688 (1996)).

Para elucidar las funciones del CXCR4 durante la embriogénesis, se examinó la expresión del CXCR4 en embriones en desarrollo mediante una hibridación *in situ*. Se detectaron altos niveles de transcritos de CXCR4 en el endotelio de los vasos sanguíneos en desarrollo durante la embriogénesis.

Basándose en este descubrimiento, se investigó el efecto de la deficiencia del gen del CXCR4 sobre la vascularización. En una inspección visual, los vasos vitelinos y umbilicales eran normales. El examen histológico de los embriones E18.5 $CXCR4^{-/-}$ mostró la presencia de los principales vasos sanguíneos, incluyendo la aorta, la vena cava, la arteria carótida, la vena yugular, la arteria celíaca y la arteria mesentérica superior y la vena mesentérica superior. Para visualizar el sistema vascular de los órganos se inmunotiñeron entonces preparaciones completas de embriones naturales y mutantes con un anticuerpo anti-PECAM-1. Se sabe que PECAM-1 se expresa específicamente y de forma estable en todas las células endoteliales durante el periodo embrionario. (Vecchi, A. y col. Eur. J. cell Biol. 63, 247-255 (1994); Baldwin, H. S. y col., Development 120, 2539-2558 (1994)).

Consecuentemente, en el tracto gastrointestinal, incluyendo el estómago, el intestino y el mesenterio, se observó una red vascular homogénea altamente ramificada, tanto en el de tipo natural como en el mutante, alrededor de E11.5. Se observó la formación de vasos sanguíneos grandes y pequeños mediante un remodelado en el mesenterio, que conectaban con el asa intestinal media aproximadamente en E12.5. Como muestra la Fig. 3, se formaron muchas grandes ramificaciones de la arteria y la vena mesentérica superior que aportaban nutrientes al intestino en los embriones naturales en E13.5. Por otro lado, estas grandes ramificaciones no estaban presentes en los mesenterios de los embriones $CXCR4^{-/-}$ en E13.5; en su lugar solo se formaron vasos pequeños. El análisis histológico al microscopio reveló arterias y venas mesentéricas superiores en los mesenterios de los embriones naturales en E13.5. Esto demostró que los vasos ramificados estaban duplicados entre la arteria y la vena (Fig. 4). Por el contrario, la mayoría de los vasos de los embriones $CXCR4^{-/-}$ no estaban duplicados, sino que eran simples, como puede observarse en la Fig. 8. Sin embargo, las arterias y venas mesentéricas superiores de los mesenterios embriones de tipo natural eran normales. En los embriones de tipo natural E17.5, los grandes vasos mesentéricos se dividen en varias ramas y alcanzan el intestino (Figs. 5 y 6). Sin embargo, en los embriones $CXCR4^{-/-}$ dichos vasos, correspondientes a los grandes vasos mesentéricos, estaban sustancialmente ausentes (Figs. 6 y 9). También se observaron unos pocos grandes vasos con ramificaciones aberrantes en los mesenterios mutantes (Figs. 6 y 9). En la mayoría de los embriones mutantes E16.5 se observaron múltiples lesiones hemorrágicas en sus intestinos delgados debidas a dicho sistema vascular defectuoso. Se cree que esta patogenia es el resultado de una aberración del sistema circulatorio que domina el intestino (Fig. 11).

Los resultados mencionados anteriormente han demostrado que el CXCR4 es esencial para la normal vascularización de intestino delgado: se cree que el mecanismo es debido a que el CXCR4 está implicado en la ramificación y/o el remodelado de los vasos mesentéricos.

En el estómago se formaron grandes vasos que se ramificaban desde los vasos mesenquimatosos a lo largo de la curvatura menor y se distribuyeron por toda la superficie ventral y dorsal en los embriones de tipo natural en E13.5 (Figs. 12A y 12C). El análisis histológico reveló que estos vasos estaban ubicados entre la arteria y la vena en el ratón de tipo natural E15.5, según muestra el inserto de la Fig. 12 C. Sin embargo, no se encontraron los correspondientes vasos en los embriones mutantes (Figs. 12B y 12D). La formación de la red de pequeños vasos que rodea al estómago parecía ser normal en los embriones mutantes (Fig. 12D).

El análisis histológico de los estómagos y los intestinos de los embriones mutantes E18.5 no detectó anomalías evidentes en la organogénesis. Por ejemplo, las capas musculares lisas (tanto la capa externa como la interna) del tracto gastrointestinal de los ratones mutantes parecían ser normales en las direcciones longitudinal y vertical.

Las Figs. 3-6 son fotografías que muestran los defectos de los vasos gastrointestinales en los embriones $CXCR4^{-/-}$ y también fotografías que muestran la inmunohistotinción de los mesenterios y los intestinos de tipo natural con el anticuerpo anti-PECAM. La Fig. 3 muestra las regiones del mesenterio y del asa intestinal media en E13.5. La Fig. 5 muestra un yeyuno en E17.5. La Fig. 6 muestra un yeyuno en E17.5. La Fig. 7 muestra un corte transversal del mesenterio teñido en E13.5. Las flechas de las Figs. 3, 5 y 6 indican grandes ramificaciones de la arteria mesentérica superior o de la vena mesentérica superior que aportan nutrientes al intestino delgado en los mesenterios de tipo natural.

De forma similar, las Figs. 7-11 son fotografías que muestran los defectos de los vasos gastrointestinales en los embriones CXCR4$^{-/-}$ y también fotografías que muestran la inmunohistotinción de los mesenterios y los intestinos de los mutantes con el anticuerpo anti-PECAM. La Fig. 7 muestra las regiones del mesenterio y del asa intestinal media en E13.5. La Fig. 9 muestra un yeyuno en E17.5. Fig. 10 muestra un yeyuno en E17.5. La Fig. 7 muestra un corte transversal del mesenterio teñido en E13.5. La Fig. 11 muestra las lesiones hemorrágicas del intestino sin teñir de un ratón mutante en E16.5. Las flechas de las Figs. 9 y 10 indican grandes vasos que muestran un recorrido y/o ramificaciones aberrantes en los ratones mutantes.

Las Figs. 12A-12D son fotografías que muestran los resultados de la inmunohistotinción de los estómagos con el anticuerpo anti-PECAM. Las Figs. 12A y 12B muestran E13.5; las Figs. 12C y 12D muestran E15.5; las Figs. 12A y 12C muestran los tipos naturales; y las Figs. 12B y 12D muestran los mutantes. El inserto en la fotografía de la Fig. 12C muestra una sección teñida con hematoxilina y eosina de grandes vasos en la pared de un estómago teñido en E15.5. Las flechas de las Figs. 12A y 12C indican grandes vasos observados únicamente en el mutante. "du" representa duodeno; "p" representa la parte proximal del asa intestinal media; "dm" representa la parte distal del asa intestinal media; "a" representa arteria; y "v" representa vena.

Estos descubrimientos indican que las anomalías en la vascularización de los ratones CXCR4$^{-/-}$ no son una consecuencia secundaria de las de los propios tractos gastrointestinales. También se observaron anomalías similares a las de la vascularización en los ratones que carecían de PBSF/SDF-1.

El análisis de hibridación *in situ* indicó que los transcritos de CXCR4 se expresaban en las células endoteliales de los vasos sanguíneos en el mesenterio y en la pared del intestino y el estómago en los embriones de tipo natural E12.5 (Figs. 13B y 13E). Particularmente, se observó una fuerte expresión en las células endoteliales de las ramificaciones que surgían de las arterias mesentéricas superiores (Figs. 13B y 13E). Por el contrario, se expresaban altos niveles de PBSF/SDF-1 en las células mesenquimatosas que rodean a las células endoteliales del mesenterio, pero no en las células endoteliales o de la pared del intestino en el estómago (Fig. 13C).

Las Figs. 13A-13F son fotografías que muestran un análisis de la expresión de CXCR4 y de PBSF/SDF-1 en el tracto gastrointestinal mediante una hibridación *in situ*. Se usaron cortes sucesivos del mesenterio de tipo natural que conectaba con el asa intestinal media; una porción se tiñó con hematoxilina y eosina (Figs. 13A y 13D); otra porción se hibridó con la sonda específica para CXCR4 (Figs. 13B y 13E); una porción adicional se hibridó con la sonda específica para PBSF/SDF-1 (Fig. 13E). Las Figs. 13D y 13E son ampliaciones de los vasos ramificados que surgen de la arteria mesentérica superior mostrada en las Figs. 13A y 13B, indicando una fuerte expresión de CXCR4 en las células endoteliales del vaso. Las flechas y las cabezas de flecha de las Figs. 13B y 13E indican las células industriales de los vasos sanguíneos mesentéricos con la expresión observada del CXCR4. El PBSF/SDF-1 es expresado en las células mesenquimatosas que rodean a las células endoteliales del mesenterio (Fig. 13E). La Fig. 13F es un corte transversal de la médula ósea del embrión de tipo natural E18.5, que muestra la expresión del CXCR4 en células hematopoyéticas, pero no en células estromales fusiformes. "m" representa mesenterio; "i" representa intestino; "a" representa arteria mesentérica superior; y "v" representa vena mesentérica superior.

Los patrones de expresión obtenidos indican que el PBSF/SDF-1 producido por las células mesenquimatosas actúa sobre el CXCR4 de las células endoteliales; y esto sugiere fuertemente la presencia de una señal paracrina por parte de una citocina que juega un papel extremadamente importante en el mesénquima mesentérico. Por lo tanto, el fenotipo que carece de los grandes vasos en el estómago CXCR4$^{-/-}$ y PBSF/SDF-1$^{-/-}$ puede ser el resultado de anomalías en la ramificación y/o el remodelado vascular en el mesénquima a lo largo de la curvatura menor del estómago.

Para examinar los sistemas vasculares de otros órganos, se tiñeron preparaciones completas de saco vitelino, cerebro y corazón con un anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1. No hubo una diferencia evidente entre CXCR4$^{-/-}$ y PBSF/SDF-1$^{-/-}$ y el tipo natural en la formación de los grandes y pequeños vasos en la preparación completa de saco vitelino (E12.5, E14.5), la región de la cabeza (E11.5) y el corazón (E12.5-E14.5).

En resumen, los resultados experimentales mencionados anteriormente han demostrado que CXCR4 y PBSF/SDF-1 son esenciales para la formación de un sistema vascular maduro que abastece al tracto gastrointestinal, actuando sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos y regulando la ramificación y/o el remodelado vascular.

Un análisis citométrico de flujo reveló que el número de progenitores de linfocitos B en hígados fetales de ratones CXCR4$^{-/-}$ estaba gravemente reducido. El análisis histológico no detectó mielocitos ni sus progenitores en la cavidad medular. Además, se encontraron defectos en la porción membranosa del tabique ventricular cardiaco en los corazones de los ratones mutantes E18.5. Estas anomalías eran muy similares al fenotipo hallado en los ratones que carecen de PBSF/SDF-1, lo que apoyaba la creencia de que el CXCR4 es un receptor fisiológico primario para el PBSF/SDF-1.

En la médula ósea embrionaria de tipo natural E18.5, según se determinó mediante una hibridación *in situ*, los transcritos de CXCR4 se expresaban en células hematopoyéticas, mientras que no se expresaban en células estromales fusiformes, en las se había observado la expresión de los transcritos de PBSF/SDF-1 (Fig. 3D). Los resultados de estos patrones de expresión indican la presencia de una señalización paracrina en la médula ósea.

Los análisis de los receptores de las cinasas de tirosina (RTC), tales como Flk-1 y Tie-2 y sus ligandos, tales como VEGF, angiopoyetina-1 y PDGF-B, de los que se ha informado hasta la fecha, usando ratones mutantes, han indicado que juegan un papel importante en el desarrollo del sistema vascular y que muchos de ellos son necesarios para la etapa más temprana de vascularización en la génesis, así como para la vascularización, de todas las partes del cuerpo, incluyendo el saco vitelino y la vasculatura extraembrionaria. (Shalaby, F. y col., Nature 376, 62-66 (1995); Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L., Nature 376, 66-70 (1995); Dumount, D. H. y col., Genes Dev 8, 1897-1909 (1994); Sato, T. N. y col., Nature, 376, 70-74 (1995); Carmeliet, P. y col., Nature, 880, 435-439 (1996); Ferrara, N. y col., Nature, 380, 439-442 (1996); y Suri, C. y col., Cell 87, 1171-1180 (1996)).

Por el contrario, las funciones de CXCR4 y de PBSF/SDF-1 operan en etapas más tardías de la génesis y son específicas del órgano. Se cree que el Tie-2 y su ligando, la angiopoyetina-1, son necesarios para la ramificación y/o el remodelado en el sistema vascular temprano. (Sato, T. N. y col., Nature 376, 70-74 (1995); Suri, C. y col., Cell 87, 1171-1180 (1996)). Sus papeles en la formación del sistema vascular maduro del tracto gastrointestinal no están claros. Las evidentes anomalías encontradas en el sistema vascular del saco vitelino vascular de ratones Tie-2 o angiopoyetina-$l^{-/-}$ no se apreciaron en los ratones CXCR4 ni PBSF/SDF-$1^{-/-}$. Se ha informado de que las quimiocinas CXC, tales como PF4 (Maione, T. E. y col., Science 247, 77-79 (1990)), IL-8 (Koch, A. E. y col., Science 258, 1798-1801 (1992)), IP-10 (Luster, A. D. y col., J. Exp. Med. 182, 219-231 (1995)) y Groβ (Cao, Y. H. y col., J. J. Exp. Med. 182, 2069-2077 (1995)), son reguladores de la de neovascularización. Sin embargo, todavía no se ha elucidado la expresión de sus receptores en células endoteliales ni sus papeles fisiológicos. Aunque se ha demostrado que el factor de coagulación V (Cui, J. y col., Nature, 384, 66-68 (1996)) y el factor tisular (Carmeliet, P. y col., Nature 883, 75-78 (1996)) son esenciales para el sistema vascular del saco vitelino, no está claro en cuanto a qué tipo de aceptor media en estos factores.

Con los antecedentes mencionados anteriormente, puede decirse que esta invención ha demostrado la presencia de un nuevo sistema de señalización --quimiocinas y receptores acoplados a proteínas G que abarcan siete dominios transmembrana- esencial para la vascularización.

Recientemente se ha demostrado que los ratones que carecen de la subunidad α de la proteína heterotrimérica Gα13 de unión al GTP presentan anomalías, tales como la no formación un sistema vascular en el saco vitelino y una expansión de los pequeños vasos embrionarios. Aunque los fenotipos son diferentes de los de los ratones que carecen de CXCR4, es necesario examinar la posibilidad de que los CXCR4 se acoplen a la Gα13.

Se sabe que CXCR4 y CCR5 son correceptores esenciales cuando cepas de VIH-1 tróficas de linfocitos T y de macrófagos infectan respectivamente a sus células huésped. (Feng, Y. y col., Science 272, 872-877 {1996); Fauci, A. S., Nature 884, 529-584 (1996)). Entre los dos han descubierto la población homocigota para la deleción CCR5; y son resistentes a la infección por VIH-1 y no tienen problemas de salud evidentes. (Liu, R. y col., Cell 86, 367-377 (1996); Samson, M. y col., Nature 382, 722-725 (1996); y Dean, M. y col., Science 273, 1856-1861).

Con respecto al otro CXCR4, se ha sugerido fuertemente, sin embargo, que es poco probable que se produzca la deleción CXCR4 homóloga en seres humanos, dado que los ratones que carecen de CXCR4 tienden a morir en el útero. Todavía queda la posibilidad de que puedan existir factores genéticos adicionales o mutaciones homólogas viables en supervivientes a largo plazo que sean resistentes al VIH-1 trófico de linfocitos T.

Aplicabilidad industrial

Basándose en el descubrimiento de esta invención, de que se suprime la vascularización en ratones con genes CXCR4 inactivados, puede prepararse un inhibidor de la vascularización que comprende como ingrediente eficaz una sustancia que inhibe la acción del CXCR4: dado que la vascularización es esencial para el mantenimiento y la expansión de los tejidos cancerosos, el descubrimiento es utilizado en la preparación de un agente antineoplásico que comprende como ingrediente eficaz una sustancia que inhibe la acción del CXCR4.

Lista de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSIKI KAISHA

<120> Inhibidores de vascularización

<130> CGS 98-06 PCT

<140> PCT/JP99/01448

<141> 23-9-1999

<150> JP10/95448

<151> 24-3-1998

<160> 12

<210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> Mus

<400> 1

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

170 175 180
Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp
185 190 195
Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu
200 205 210
Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser Lys
215 220 225
Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
230 235 240
Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr
245 250 255
Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile
260 265 270
Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser
275 280 285
Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile
290 295 300
Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His
305 310 315
Ala Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser
320 325 330
Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu
335 340 345
Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
350

<210> 2

<211> 1588

<212> ADN

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1059)

<400> 2

atg gag ggg atc agt ata tac act tca gat aac tac acc gag gaa 45
atg ggc tca ggg gac tat gac tcc atg aag gaa ccc tgt ttc cgt 90
gaa gaa aat gct aat ttc aat aaa atc ttc ctg ccc acc atc tac 135
tcc atc atc ttc tta act ggc att gtg ggc aat gga ttg gtc atc 180
ctg gtc atg ggt tac cag aag aaa ctg aga agc atg acg gac aag 225
tac agg ctg cac ctg tca gtg gcc gac ctc ctc ttt gtc atc acg 270
ctt ccc ttc tgg gca gtt gat gcc gtg gca aac tgg tac ttt ggg 315
aac ttc cta tgc aag gca gtc cat gtc atc tac aca gtc aac ctc 360
tac agc agt gtc ctc atc ctg gcc ttc atc agt ctg gac cgc tac 405

ctg gcc atc gtc cac gcc acc aac agt cag agg cca agg aag ctg 450
ttg gct gaa aag gtg gtc tat gtt ggc gtc tgg atc cct gcc ctc 495
ctg ctg act att ccc gac ttc atc ttt gcc aac gtc agt gag gca 540
gat gac aga tat atc tgt gac cgc ttc tac ccc aat gac ttg tgg 585
gtg gtt gtg ttc cag ttt cag cac atc atg gtt ggc ctt atc ctg 630
cct ggt att gtc atc ctg tcc tgc tat tgc att atc atc tcc aag 675
ctg tca cac tcc aag ggc cac cag aag cgc aag gcc ctc aag acc 720
aca gtc atc ctc atc ctg gct ttc ttc gcc tgt tgg ctg cct tac 765
tac att ggg atc agc atc gac tcc ttc atc ctc ctg gaa atc atc 810
aag caa ggg tgt gag ttt gag aac act gtg cac aag tgg att tcc 855
atc acc gag gcc cta gct ttc ttc cac tgt tgt ctg aac ccc atc 900
ctc tat gct ttc ctt gga gcc aaa ttt aaa acc tct gcc cag cac 945
gca ctc acc tct gtg agc aga ggg tcc agc ctc aag atc ctc tcc 990
aaa gga aag cga ggt gga cat tca tct gtt tcc act gag tct gag 1035
tct tca agt ttt cac tcc agc taa cacagatgta aaagactttt ttttat 1085
acgataaata actttttttt aagttacaca tttttcagat ataaaagact gaccaatatt 1145
gtacagtttt tattgcttgt tggatttttg tcttgtgttt ctttagtttt tgtgaagttt 1205
aattgactta tttatataaa tttttttgt ttcatattga tgtgtgtcta ggcaggacct 1265
gtggccaagt tcttagttgc tgtatgtctc gtggtaggac tgtagaaaag ggaactgaac 1325
attccagagc gtgtagttaa tcacgtaaag ctagaaatga tccccagctg tttatgcata 1385
gataatctct ccattcccgt ggaacgtttt tcctgttctt aagacgtgat tttgctgtag 1445
aagatggcac ttataaccaa agcccaaagt ggtatagaaa tgctggtttt tcagttttca 1505
ggagtgggtt gatttcagca cctacagtgt acagtcttgt attaagttgt taataaaagt 1565
acatgttaaa cttaaaaaaa aaa 1588

<210> 3

<211> 359

<212> PRT

<213> Mus

<400> 3

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

Phe Gly Lys Phe Leu Cys Lys Ala Val His Ile Ile Tyr Thr Val
110 115 120
Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp
125 130 135
Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg
140 145 150
Lys Leu Leu Ala Glu Lys Ala Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro
155 160 165
Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asp Val Ser
170 175 180
Gln Gly Asp Ile Ser Gln Gly Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg
185 190 195
Leu Tyr Pro Asp Ser Leu Trp Met Val Val Phe Gln Phe Gln His
200 205 210
Ile Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys
215 220 225
Tyr Cys Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln
230 235 240
Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe
245 250 255
Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Val Gly Ile Ser Ile Asp Ser
260 265 270
Phe Ile Leu Leu Gly Val Ile Lys Gln Gly Cys Asp Phe Glu Ser
275 280 285
Ile Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe
290 295 300
His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys
305 310 315
Phe Lys Ser Ser Ala Gln His Ala Leu Asn Ser Met Ser Arg Gly
320 325 330
Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser
335 340 345
Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
350 355

<210> 4

<211> 1758

<212> ADN

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1080)

<400> 4

atg gaa ccg atc agt gtg agt ata tac act tct gat aac tac tct 45
gaa gaa gtg ggg tct gga gac tat gac tcc aac aag gaa ccc tgc 90
ttc cgg gat gaa aac gtc cat ttc aat agg atc ttc ctg ccc acc 135
atc tac ttc atc atc ttc ttg act ggc ata gtc ggc aat gga ttg 180
gtg atc ctg gtc atg ggt tac cag aag aag cta agg agc atg acg 225
gac aag tac cgg ctg cac ctg tca gtg gct gac ctc ctc ttt gtc 270
atc aca ctc ccc ttc tgg gca gtt gat gcc atg gct gac tgg tac 315
ttt ggg aaa ttt ttg tgt aag gct gtc cat atc atc tac act gtc 360
aac ctc tac agc agc gtt ctc atc ctg gcc ttc atc agc ctg gac 405
cgg tac ctc gcc att gtc cac gcc acc aac agt caa agg cca agg 450
aaa ctg ctg gct gaa aag gca gtc tat gtg ggc gtc tgg atc cca 495
gcc ctc ctc ctg act ata cct gac ttc atc ttt gcc gac gtc agc 540
cag ggg gac atc agt cag ggg gat gac agg tac atc tgt gac cgc 585
ctt tac ccc gat agc ctg tgg atg gtg gtg ttt caa ttc cag cat 630
ata atg gtg ggt ctc atc ctg ccc ggc atc gtc atc ctc tcc tgt 675
tac tgc atc atc atc tct aag ctg tca cac tcc aag ggc cac cag 720
aag cgc aag gcc ctc aag acg aca gtc atc ctc atc cta gct ttc 765
ttt gcc tgc tgg ctg cca tat tat gtg ggg atc agc atc gac tcc 810
ttc atc ctt ttg gga gtc atc aag caa gga tgt gac ttc gag agc 855
att gtg cac aag tgg atc tcc atc aca gag gcc ctc gcc ttc ttc 900
cac tgt tgc ctg aac ccc atc ctc tat gcc ttc ctc ggg gcc aag 945
ttc aaa agc tct gcc cag cat gca ctc aac tcc atg agc aga ggc 990
tcc agc ctc aag atc ctt tcc aaa gga aag cgg ggt gga cac tct 1035
tcc gtc tcc acg gag tca gaa tcc tcc agt ttt cac tcc agc taa 1080
cccttatgca aagacttata taatatatat atatatatga taaagaactt ttttatgtta 1140
cacattttcc agatataaga gactgaccag tcttgtacag tttttttttt tttttaattg 1200
actgttggga gtttatgttc ctctagtttt tgtgaggttt gacttaattt atataaatat 1260
tgtttttgt ttgtttcatg tgaatgagcg tctaggcagg acctgtggcc aagttcttag 1320
tagctgttta tctgtgtgta ggactgtaga actgtagagg aagaaactga acattccaga 1380
atgtgtggta aattgaataa agctagccgt gatcctcagc tgttgctgca taatctcttc 1440
attccgagga gcaccccacc cccacccccca cccccacccc attcttaaat tgtttggtta 1500
tgctgtgtga tggtttgttt ggtttttttt tgttgttgtt gttgtttttt ttttctgtaa 1560
aagatggcac ttaaaaccaa agcctgaaat ggtggtagaa atgctggggt tttttttgtt 1620
tgtttgtttt ttcagttttc aagagtagat tgacttcagt ccctacaaat gtacagtctt 1680
gtattacatt gttaataaaa gtcaatgata aacttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1758

<210> 5

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Péptido ligando

<400> 5

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala
5 10 15
Leu Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys
20 25 30
Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys
35 40 45
His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val
50 55 60
Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys
65 70 75
Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
80 85

<210> 6

<211> 2244

<212> ADN

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (471)...(743)

<400> 6

gcacgggaca ggccgggcca cacccaccgg ggcgagctcg gagggcggcg ctctgggcgg 60
agggcccggc ggctcggccc agggcgcgtt acctcgtcgc cggggccgga gagggcgggc 120
ggaggcacgg ggcctggagg cgccaggcgg aggatgcggg cgacacggtg gcggcggcga 180
ccgcgcgacc gggcgggcgg gcgggcaggg gcgagcggag ggagggagcg gactgcggca 240
ggatctgtcg aggaaaaatc ttgcggccgg cgattccccg ccttttaagc gcagcctgca 300
ctccccccac cccacgcagg ggcgggcctt ccccaacgcg ggcgcccact ggccgccgcg 360
cgccgctccc ctccagctcg cctgcgcctc tcactctccg tcagccgcat tgcccgctcg 420
gcgtccggcc cccgacccgc gctcgtccgc ccgcccgccc gcccgcccgc gcc 473
atg aac gcc aag gtc gtg gtc gtg ctg gtc ctc gtg ctg acc gcg 518
ctc tgc ctc agc gac ggg aag ccc gtc agc ctg agc tac aga tgc 563
cca tgc cga ttc ttc gaa agc cat gtt gcc aga gcc aac gtc aag 608
cat ctc aaa att ctc aac act cca aac tgt gcc ctt cag att gta 653
gcc cgg ctg aag aac aac aac aga caa gtg tgc att gac ccg aag 698
cta aag tgg att cag gag tac ctg gag aaa gct tta aac aag taa 743
gcacaacagc caaaaaggac tttccgctag acccactcga ggaaaactaa aaccttgtga 803
gagatgaaag ggcaaagacg tgggggaggg ggccttaacc atgaggacca ggtgtgtgtg 863
tggggtgggc acattgatct gggatcgggc ctgaggtttg ccagcattta gaccctgcat 923
ttatagcata cggtatgata ttgcagctta tattcatcca tgccctgtac ctgtgcacgt 983
tggaattttt attactgggg tttttctaag aaagaaattg tattatcaac agcattttca 1043
agcagttagt tccttcatga tcatcacaat catcatcatt ctcattctca tttttaaat 1103
caacgagtac ttcaagatct gaatttggct tgtttggagc atctcctctg ctcccctggg 1163

gagtctgggc acagtcaggt ggtggcttaa cagggagctg gaaaaagtgt cctttcttca 1223
gacactgagg ctcccgcagc agcgcccctc ccaagaggaa ggcctctgtg gcactcagat 1283
accgactggg gctgggcgcc gccactgcct tcacctcctc tttcaacctc agtgattggc 1343
tctgtgggct ccatgtagaa gccactatta ctgggactgt gctcagagac ccctctccca 1403
gctattccta ctctctcccc gactccgaga gcatgcatta atcttgcttc tgcttctcat 1463
ttctgtagcc tgatcagcgc cgcaccagcc gggaagaggg tgattgctgg ggctcgtgcc 1523
ctgcatccct ctcctcccag ggcctgcccc acagctcggg ccctctgtga gatccgtctt 1583
tggcctcctc cagaatggag ctggccctct cctggggatg tgtaatggtc cccctgctta 1643
cccgcaaaag acaagtcttt acagaatcaa atgcaatttt aaatctgaga gctcgctttg 1703
agtgactggg ttttgtgatt gcctctgaag cctatgtatg ccatggaggc actaacaaac 1763
tctgaggttt ccgaaatcag aagcgaaaaa atcagtgaat aaaccatcat cttgccacta 1823
ccccctcctg aagccacagc agggtttcag gttccaatca gaactgttgg caaggtgaca 1883
tttccatgca taaatgcgat ccacagaagg tcctggtggt atttgtaact ttttgcaagg 1943
catttttta tatatatttt tgtgcacatt tttttttacg tttctttaga aaacaaatgt 2003
atttcaaaat atatttatag tcgaacaatt catatatttg aagtggagcc atatgaatgt 2063
cagtagttta tacttctcta ttatctcaaa ctactggcaa tttgtaaaga aatatatatg 2123
atatataaat gtgattgcag cttttcaatg ttagccacag tgtatttttt cacttgtact 2183
aaaattgtat caaatgtgac attatatgca ctagcaataa aatgctaatt gtttcatggt 2243
a 2244

<210> 7

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Péptido ligando

<400> 7

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala
5 10 15
Leu Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys
20 25 30
Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys
35 40 45
His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val
50 55 60
Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys
65 70 75
Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
80 85

<210> 8

<211> 1781

<212> ADN

<213> Mua

<220>

<221> CDS

<222> (82)...(351)

<400> 8

gaccactttc cctctcggtc cacctcggtg tcctcttgct gtccagctct gcagcctccg 60
gcgcgccctc ccgcccacgc c 81
atg gac gcc aag gtc gtc gcc gtg ctg gcc ctg gtg ctg gcc gcg 126
ctc tgc atc agt gac ggt aaa cca gtc agc ctg agc tac cga tgc 171
ccc tgc cgg ttc ttc gag agc cac atc gcc aga gcc aac gtc aag 216
cat ctg aaa atc ctc aac act cca aac tgt gcc ctt cag att gtt 261
gca cgg ctg aag aac aac aac aga caa gtg tgc att gac ccg aaa 306
tta aag tgg atc caa gag tac ctg gag aaa gct tta aac aag taa 351
gcacaacagc ccaaaggact ttccagtaga cccccgagga aggctgacat ccgtgggaga 411
tgcaagggca gtggtgggga ggagggcctg aaccctggcc aggatggccg gcgggacagc 471
actgactggg gtcatgctaa ggtttgccag cataaagaca ctccgccata gcatatggta 531
cgatattgca gcttatattc atccctgccc tcgcccgtgc acaatggagc ttttataact 591
ggggtttttc taaggaattg tattacccta accagttagc ttcatcccca ttctcctcat 651
cctcatcttc attttaaaaa gcagtgatta cttcaagggc tgtattcagt ttgctttgga 711
gcttctcttt gccctggggc ctctgggcac agttatagac ggtggctttg cagggagccc 771
tagagagaaa ccttccacca gagcagagtc cgaggaacgc tgcagggctt gtcctgcagg 831
gggcgctcct cgacagatgc cttgtcctga gtcaacacaa gatccggcag agggaggctc 891
ctttatccag ttcagtgcca gggtcgggaa gcttccttta gaagtgatcc ctgaagctgt 951
gctcagagac cctttcctag ccgttcctgc tctctgcttg cctccaaacg catgcttcat 1011
ctgacttccg cttctcacct ctgtagcctg acggaccaat gctgcaatgg aagggaggag 1071
agtgatgtgg ggtgcccccct ccctctcttc cctttgcttt cctctcactt gggccctttg 1131
tgagattttt ctttggcctc ctgtagaatg gagccagacc atcctggata atgtgagaac 1191
atgcctagat ttacccacaa aacacaagtc tgagaattaa tcataaacgg aagtttaaat 1251
gaggatttgg accttggtaa ttgtccctga gtcctatata tttcaacagt ggctctatgg 1311
gctctgatcg aatatcagtg atgaaaataa taataataat aataataacg aataagccag 1371
aatcttgcca tgaagccaca gtggggattc tgggttccaa tcagaaatgg agacaagata 1431
aaacttgcat acattcttat gatcacagac ggccctggtg gtttttggta actatttaca 1491
aggcattttt ttacatatat ttttgtgcac tttttatgtt tctttggaag acaaatgtat 1551
ttcagaatat atttgtagtc aattcatata tttgaagtgg agccatagta atgccagtag 1611
atatctctat gatcttgagc tactggcaac ttgtaaagaa atatatatga catataaatg 1671
tattgtagct ttccggtgtc agccacggtg tatttttcca cttggaatga aattgtatca 1731
actgtgacat tatatgcact agcaataaaa tgctaattgt ttcatgctgt 1781

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido añadido

<400> 9

Arg Phe Lys Met

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido añadido

<400> 10

Arg Leu Lys Met

<210> 11

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

tagcggccgc gttgccatgg aaccgat 27

<210> 12

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 12

gcgtcgactt tgcataaggg ttagctg 27

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un cáncer sólido, que comprende una sustancia que inhibe la acción debida al CXCR4, en el que la sustancia se selecciona del grupo que consiste en

(1) una sustancia que inhibe la unión entre el SDF-1 y el CXCR4;

(2) una sustancia que inhibe la señalización desde el CXCR4 hacia los núcleos;

(3) una sustancia que inhibe la expresión del CXCR4; y

(4) una sustancia que inhibe la expresión del SDF-1,

en la que la sustancia es un anticuerpo anti-SDF-1, o un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-SDF-1, o un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-CXCR4.

2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la sustancia inhibe el SDF-1.

3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la sustancia inhibe el CXCR4.

4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que la sustancia inhibe el CXCR4 en competición antagonista con el SDF-1.

5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que la sustancia inhibe que el SDF-1 se una al CXCR4 uniéndose al SDF-1.

6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la sustancia es una seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-SDF-1 y un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-SDF-1.

7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en la que la sustancia inhibe el CXCR4 en competición antagonista con el CXCR4 para unión al SDF-1.

8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en la que la sustancia inhibe que el SDF-1 se una al CXCR4 uniéndose al CXCR4.

9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que la sustancia es una seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CXCR4 y un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad de anticuerpo anti-CXCR4.

10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la sustancia es una sustancia que inhibe la expresión misma de CXCR4 y es un inhibidor contra el sitio de control de expresión de CXCR4.

11. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la sustancia muestra inhibición contra el sitio de control de expresión del SDF-1.

12. Un procedimiento para rastrear una sustancia que trata un cáncer sólido en base a la inhibición de la acción debida al CXCR4, en el que la sustancia es un anticuerpo anti-SDF-1, o un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-SDF1, o un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-CXCR4.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, que comprende una etapa de identificar una sustancia que inhibe la acción debida al CXCR4 como una sustancia que trata un cáncer sólido.

14. Procedimiento según la reivindicación 12, que comprende una etapa de identificar una sustancia que inhibe (1) la unión entre el SDF-1 y el CXCR4, (2) la señalización desde el CXCR4 a los núcleos, (3) la expresión del CXCR4, o (4) la expresión del SDF-1 como una sustancia que trata un cáncer sólido.

15. Un procedimiento para evaluar la actividad anti-tumores sólidos de una sustancia, en base a la inhibición de la acción debida al CXCR4, en el que la sustancia es un anticuerpo anti-SDF-1, o un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-SDF-1, o un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento de dicho anticuerpo que posee la actividad del anticuerpo anti-CXCR4.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, que comprende una etapa de medir la actividad inhibidora de la acción debida al CXCR4.

17. Procedimiento según la reivindicación 15, que comprende una etapa de medir la actividad inhibidora de (1) la unión entre el SDF-1 y el CXCR4, (2) la señalización desde el CXCR4 hasta los núcleos, (3) la expresión del CXCR4, o (4)

la expresión del SDF-1.

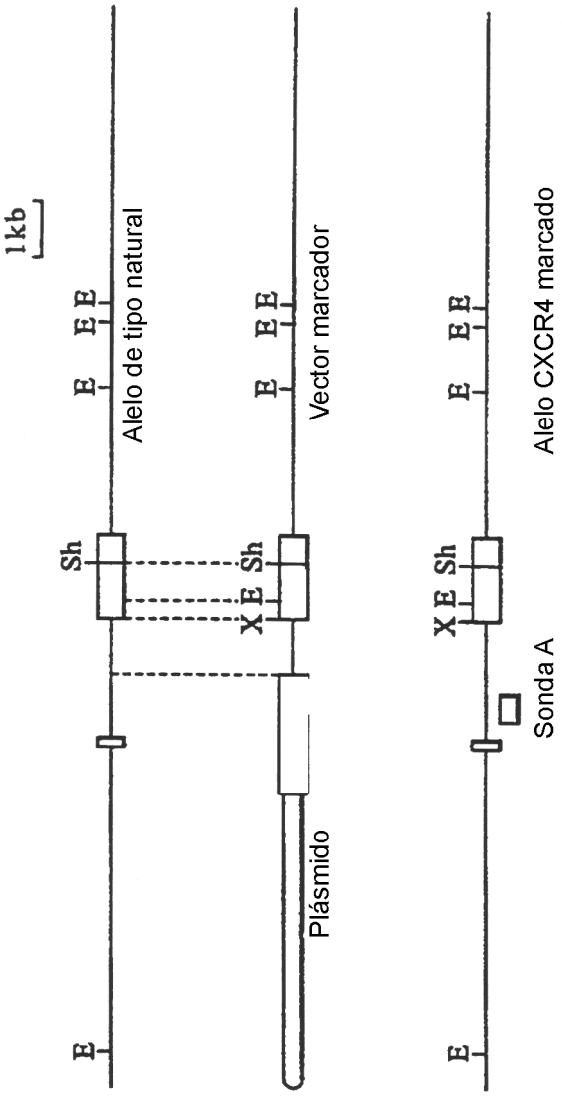
1kb
E
Sh
E E
Alelo de tipo natural
X E Sh
E E
Vector marcador
Plásmido
X E Sh
E E
Sonda A
Alelo CXCR4 marcado

Fig.1

Fig.2A

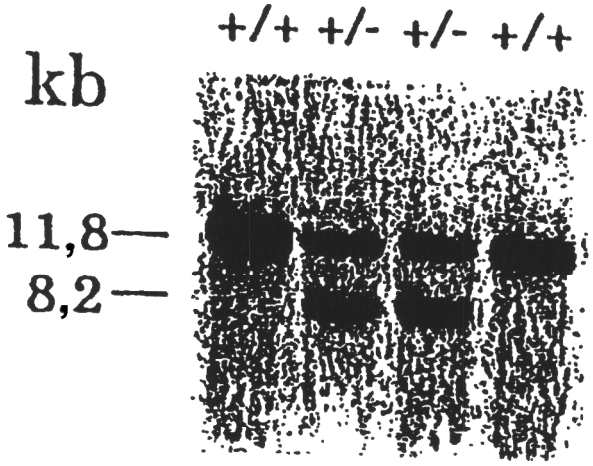

Fig.2B

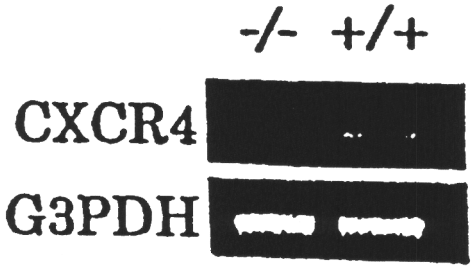

Fig.3

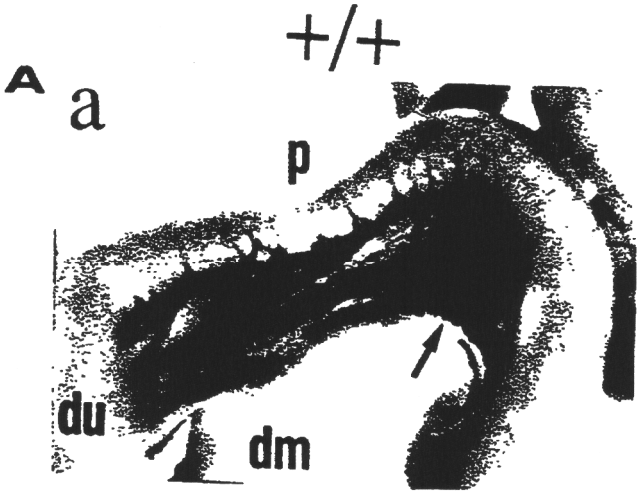

Fig.4

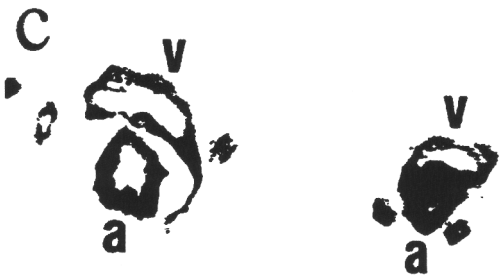

Fig.5

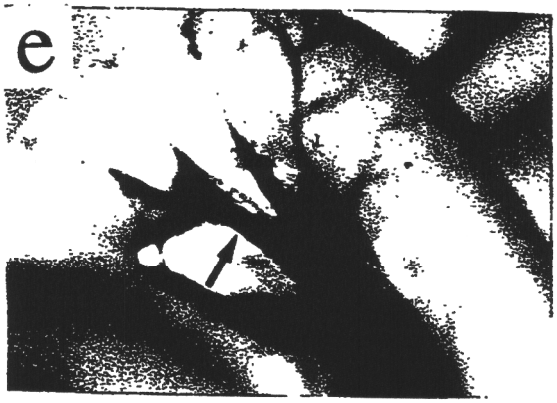

Fig.6

Fig.7

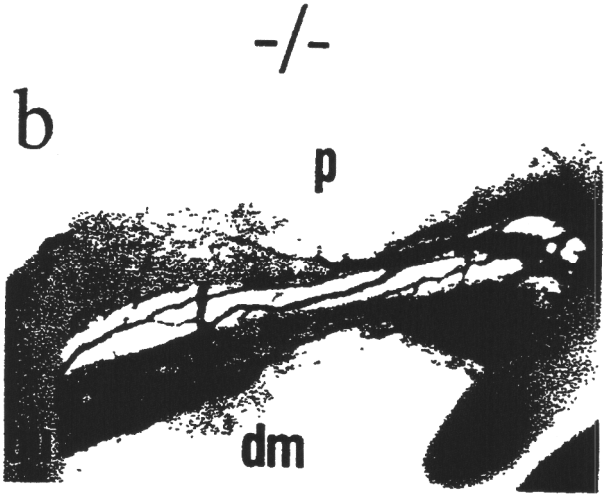

Fig.8

Fig.9

Fig.10

Fig.11

Fig.12A

Fig.12B

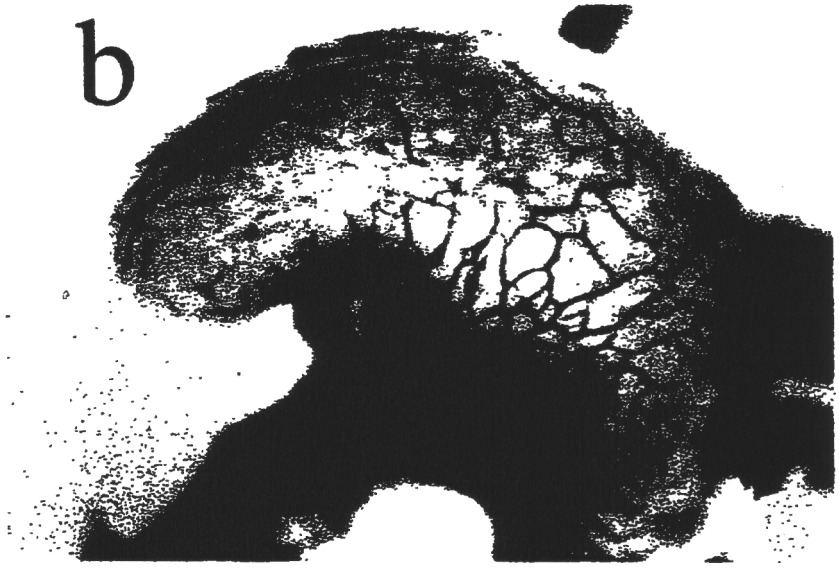

Fig.12C

Fig.12D

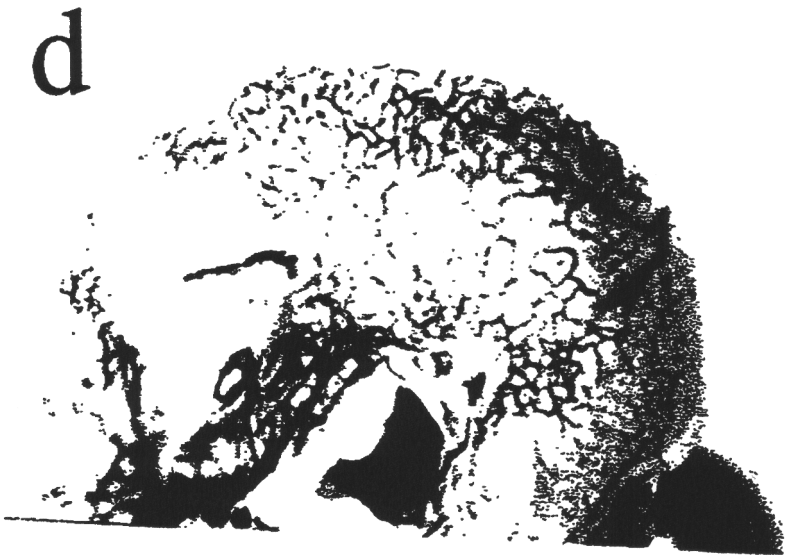

Fig.13A

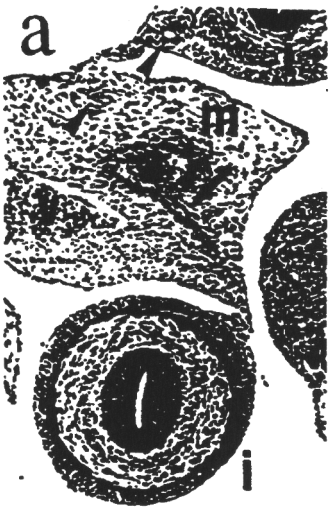

Fig.13B

Fig.13C

Fig.13D

Fig.13E

Fig.13F