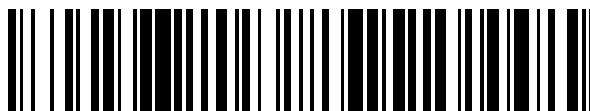


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 030**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010 E 10757617 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2473529**

54 Título: **Inhibidores de CLEC14A**

30 Prioridad:

03.09.2009 US 239584 P

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

19.04.2016

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)**

**Angel Building 407 St John Street London
EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**BICKNELL, ROY;
ZHUANG, XIAODONG y
MURA, MANUELA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 567 030 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 CLEC14A

La presente invención desvela genes y polipéptidos específicos de endotelio tumoral, el uso anticuerpos que se unen con estos polipéptidos para capturar imágenes y dirección a la vasculatura tumoral, y el uso de inhibidores de estos genes/polipéptidos específicos de endotelio tumoral para inhibir la angiogénesis en tumores sólidos. En particular, la presente invención se refiere a CLEC14A, al uso de anticuerpos que se unen con CLEC14A para capturar imágenes y dirección a la neovasculatura tumoral, y al uso de inhibidores de CLEC14A para inhibir la angiogénesis en tumores sólidos.

El endotelio desempeña un papel central en muchos procesos fisiológicos y patológicos y se sabe que es un sitio transcripcional excepcionalmente activo. Se expresan aproximadamente 1000 genes distintos en una célula endotelial, aunque muchos de ellos no son específicos de células endoteliales. Por el contrario, se ha descubierto que glóbulos rojos expresan 8, las plaquetas 22 y el músculo liso 127 genes separados (Adams y col. (1995) *Nature* 377 (6547 Supl): 3-174). Genes específicos endoteliales conocidos atraen mucha atención tanto de la investigación básica como de la comunidad clínica. Por ejemplo, las tirosina quinasas específicas endoteliales Tie, TIE2/TEK, KDR y flt1 son agentes cruciales en la regulación de la integridad vascular, procesos inflamatorios mediados por endotelio y angiogénesis.

Los inventores han usado previamente un enfoque de exploración de base de datos por ordenador para identificar genes específicos endoteliales, y han identificado cuatro genes específicos endoteliales candidatos nuevos, ninguno de los cuales fueron CLEC14A (Huminiacki y Bicknell (2000) "In silico cloning of novel endothelial-specific genes." *Genome Res.* 10: 1796-1806).

Ho y col. usaron extracción de datos y análisis de expresión en micromatrices para identificar genes específicos endoteliales e identificar los 64 genes que eran específicos para células endoteliales o se expresaban preferentemente el menos 3 veces en células endoteliales, ninguno de los cuales era CLEC14A (Ho y col. (2003) "Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis." *Physiol Genomics.* 13: 249-262).

Wallgard y col. analizaron datos de expresión de micromatrices públicamente disponibles e identificaron un conjunto principal de 58 genes con expresión amplia, específica endotelial, en la microvasculatura. Este conjunto incluye la mayoría de marcadores endoteliales conocidos y usados en la actualidad, así como genes que no se habían ligado previamente a la función endotelial, ninguno de los cuales eran CLEC14A (Wallgard y col. (2008) "Identification of a core set of 58 gene transcripts with broad and specific expression in the microvasculature." *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 28: 1469-1476).

Las células endoteliales forman una única capa celular que reviste todos los vasos sanguíneos y regula los intercambios entre el torrente sanguíneo y los tejidos circundantes. Se desarrollan nuevos vasos sanguíneos desde las paredes de vasos pequeños existentes mediante el crecimiento de células endoteliales en el proceso denominado angiogénesis. Las células endoteliales tienen incluso la capacidad de formar tubos capilares huecos cuando se aíslan en cultivo. Una vez que el sistema vascular está completamente desarrollado, las células endoteliales de vasos sanguíneos normalmente permanecen estáticas sin formación de nuevos vasos, con la excepción de la formación de nuevos vasos sanguíneos en la curación de heridas natural.

Sin embargo, algunos tumores atraen un nuevo aporte sanguíneo secretando factores que estimulan a las células endoteliales cercanas para que construyan nuevos brotes capilares. La angiogénesis desempeña un papel importante en la progresión de tumores sólidos y se reconoce ampliamente como un proceso limitante de la velocidad en el crecimiento de tumores sólidos. Los tumores que no consiguen atraer un aporte sanguíneo están gravemente limitados en su crecimiento. Por lo tanto, la capacidad de inhibir la angiogénesis inapropiada o indeseable puede ser útil en el tratamiento de tumores sólidos.

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es esencial tanto para la progresión tumoral local como para el desarrollo de metástasis distantes. De hecho, el crecimiento y la supervivencia de tumores depende de su capacidad para obtener un aporte sanguíneo y se ha demostrado que el daño infligido en el endotelio tumoral erradica eficazmente tumores (Burrows y col. (1993) "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature." *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(19): 8996-9000). La angiogénesis tumoral implica la degradación de la membrana basal por tejido activado o precursores endoteliales en circulación, proliferación y migración de células endoteliales, interacción con la matriz extracelular, diferenciación morfológica, adherencia celular y formación de tubos vasculares. La inhibición de la angiogénesis tumoral es por lo tanto una diana para terapias antitumorales, que emplean inhibidores de angiogénesis solos o en combinación con tratamientos de cáncer convencionales. Sin embargo, la dirección de agentes antitumorales al sitio de angiogénesis depende de la identificación de marcadores específicos de angiogénesis tumoral. Se acepta ahora que el crecimiento de tumores sólidos depende de su capacidad para adquirir un aporte sanguíneo, y se ha dirigido un gran esfuerzo al desarrollo de agentes antiangiogénicos que alteran este proceso. También ha resultado evidente que la destrucción dirigida de la vasculatura tumoral establecida es otra vía para emocionantes oportunidades terapéuticas, y el descubrimiento de marcadores endoteliales tumorales ampliamente expresados promete un gran beneficio clínico (Neri y Bicknell (2005) "Tumour vascular targeting." *Nat*

Rev Cancer 5(6): 436-446).

Estos enfoques terapéuticos dependen de la identificación de marcadores endoteliales tumorales (TEM) específicos. En una exploración para marcadores endoteliales específicos de tumor que podrían ser candidatos para terapia tumoral antiangiogénica, St Croix y col. (2000) identificaron 79 genes que se expresaban diferencialmente entre células endoteliales derivadas de endotelio tumoral y mucosa colónica normal, ninguno de los cuales eran CLEC14A (Croix y col. (2000) "Genes expressed in human tumor endothelium." *Science* 289: 1197-202). La expresión de 33 de estos genes se elevó al menos 10 veces en células endoteliales tumorales, incluyendo 11 genes conocidos y 14 genes aún no caracterizados. La hibridación in situ en muestras tisulares confirmó que la expresión de ocho de los nueve genes no caracterizados que se estudiaron en profundidad era específica para células endoteliales tumorales. Además, estos genes también se expresaron en células endoteliales de otros tumores incluyendo tumores pulmonares y cerebrales. Excepto por un gen, estos genes también se expresaron a niveles elevados en otros estados angiogénicos tales como curación de heridas.

Khodarev y col. (2003) modelaron interacciones de células endoteliales/tumorales cocultivando células de glioma humano U87 con células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Las células U87 indujeron un fenotipo "activado" en HUVEC, incluyendo un aumento en la proliferación, migración y formación de tipo red. Se observó activación en cocultivos en los que las células estaban en contacto directo o bien físicamente separadas, lo que sugiere un papel importante para factor o factores solubles en los cambios fenotípicos y genotípicos observados. Se evaluó el perfil de expresión de células endoteliales activadas en tumores usando matrices de ADNc y se confirmó por PCR cuantitativa. Se descubrió que pares coincidentes de receptores/ligandos se expresaban de forma coordinada, incluyendo TGF β RII con TGF β 3, FGFRII y receptor de factor de crecimiento de fibroblastos rico en cisteína (CRF-1) con FGF7 y FGF12, CCR1, CCR3, CCR5 con RANTES y gen de tipo receptor de calcitonina (CALCRL) con adrenomedulina. No se identificó CLEC14A (Khodarev y col. (2003) "Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells", *Journal of Cell Science* 116: 1013-1022.)

Seaman y col. (2007) compararon los patrones de expresión génica de células endoteliales derivadas de los vasos sanguíneos de ocho tejidos en reposo normales, cinco tumores e hígado en regeneración. Seaman y col. identificaron genes endoteliales específicos de órganos, así como 25 transcritos sobreexpresados en endotelio tumoral frente a normal, 13 de los cuales no se encontraban en el endotelio angiogénico de hígado en regeneración. No se identificó CLEC14A. Se esperaba que la mayoría de los genes de angiogénesis compartidos tuvieran papeles en el control del ciclo celular, pero los específicos para endotelio tumoral eran principalmente moléculas de superficie celular de función incierta (Seaman y col. (2007) "Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis", *Cancer Cell* 11(6): 539-54).

Por extracción de datos de bibliotecas de SAGE y ADNc públicas, se identificaron previamente 459 genes endoteliales predichos, uno de los cuales es CLEC14A. De estos 459, se identificaron 27 genes/polipéptidos (sin incluir CLEC14A) cuya expresión es altamente específica para endotelio tumoral (Herbert y col. (2008) "A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes" *BMC Genomics* 9: 153 (doi: 10.1186/1471-2164-9-153)). Estos genes/polipéptidos se identificaron por lo tanto como nuevos marcadores endoteliales tumorales, que son dianas farmacológicas antineoplásicas particularmente buenas ya que pueden dirigirse directamente mediante el aporte sanguíneo.

No obstante, existe la necesidad en la técnica de marcadores endoteliales tumorales adicionales (TEM).

Se han identificado ahora un gen/polipéptido adicional, CLEC14A, que tiene un alto grado de especificidad endotelial tumoral. Se ha mostrado que CLEC14A se expresa específicamente en células endoteliales humanas, y en tejidos angiogénicos durante el desarrollo en un modelo de pez cebra. También se ha mostrado que la regulación negativa de CLEC14A usando tecnología ARNip y la inhibición de CLEC14A usando anticuerpos anti-CLEC14A redujo la migración celular endotelial, que es un componente esencial de angiogénesis. Además, se ha mostrado que la expresión de CLEC14A está regulada negativamente en respuesta a tensión de corte, que se asocia con frecuencia con la regulación negativa de genes proangiogénicos. Mediante inmunofluorescencia también se ha mostrado que CLEC14A no se expresa en tejidos adultos normales, pero se expresa en vasos neoangiogénicos de cánceres incluyendo cáncer de colon, rectal, ovárico, de hígado, de vejiga, de próstata, de mama, de riñón, de páncreas, de estómago, de esófago, de pulmón y de tiroides.

En consecuencia, los inventores concluyen que CLEC14A codifica de forma genuina un TEM. Por lo tanto, ahora los inventores consideran que el gen/polipéptido CLEC14A será valioso como un marcador del endotelio tumoral; que los anticuerpos que se unen selectivamente con el polipéptido CLEC14A pueden usarse para capturar imágenes y dirigirse a la nueva vasculatura tumoral; y que los inhibidores del gen/polipéptido CLEC14A serían terapéuticamente útiles en la inhibición de neoangiogénesis tumoral en tumores sólidos.

Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, no se ha sugerido nunca previamente un inhibidor de CLEC14A como un inhibidor de angiogénesis.

El documento WO 02/079492 (Eos Biotechnology, Inc) lista muchos cientos de EST cuya expresión se ha dicho que

varía a lo largo del tiempo en tejido angiogénico. Uno de estos EST era un EST que codificaba un fragmento de 166 restos de CLEC14A (denominado en el mismo Pkey 105729, N.º de referencia Hs46612, N.º de Unigene Hs293815, título de Unigene HSPC285). Sin embargo, el documento WO 02/079492 no proporciona ningún dato sobre la expresión de este EST durante la angiogénesis; no indica siquiera si se suponía que la expresión había o aumentado o se había reducido o si se restringía a células endoteliales tumorales.

En Herbert y col. (2008), se describió un conjunto exhaustivo de 459 genes endoteliales predichos por ordenador obtenidos combinando datos de bibliotecas de ADNc y SAGE. Aunque se identificó CLEC14A como expresado preferentemente en células endoteliales (archivo adicional 13), no estaba en los 104 genes más específicos endoteliales. En este informe temprano no se identificó CLEC14A como específico del endotelio tumoral o implicado en la angiogénesis. De hecho, no se conocía ni se propuso ninguna función para CLEC14A, y no se llevó a cabo ningún experimento corroborador adicional.

Genentech, Inc. tiene varias patentes publicadas y solicitudes de patente relacionadas con genes y polipéptidos "PRO", de los que PRO269 (Clon DNA38260-1180) es equivalente a CLEC14A. En estas patentes y solicitudes, se han atribuido múltiples papeles potenciales a PRO269. Por ejemplo, en los documentos tanto US 2003/0186358 como US 6.894.148, se ha dicho que PRO269 tiene uso como un agente antitrombótico debido a su homología con trombomodulina, y se ha dicho que tiene la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos, para inducir c-fos en neuronas corticales, y afectar a la captación de glucosa. Es más relevante que se ha descubierto que PRO269 está amplificado entre 2 y 4 veces en el ADN genómico de 8 muestras tumorales pulmonares y líneas celulares (n=20), pero no está amplificado en el ADN genómico de muestras tumorales o líneas celulares de colon (n=19), testículo (n=2) o riñón (n=1). De forma similar, en el documento US 2003/0175900, se descubrió que PRO269 estaba amplificado entre 2 y 4 veces en el ADN genómico de las mismas 8 muestras tumorales y líneas celulares de pulmón (n=50), pero no estaba amplificado en el ADN genómico de muestras tumorales y líneas celulares de colon (n=45), mama (n=18), ganglio linfático (n=3), riñón (n=2), paratiroides (n=2), resto (n=2) o testículo (n=2).

En el documento US 2003/0194775 (Genentech, Inc.) se ha dicho que PRO269 estaba sobreexpresado en tumores de pulmón y rectales, pero no en tumores de mama, de colon, del cuello uterino, de próstata o de hígado, en comparación con una muestra de control epitelial "universal" que se preparó agrupando tejidos humanos no cancerosos de origen epitelial, incluyendo tejidos de hígado, riñón y pulmón.

Por el contrario, el documento WO 03/101283 (Incyte Genomics, Inc) describe 170 transcritos cuya expresión se descubrió que estaba regulada diferencialmente en tumores de pulmón. De estos, se descubrió que un transcrito equivalente a CLEC14A (denominado en el presente documento ID 2264002CB1, N.º de referencia de Genbank g15209752) estaba entre 4 y 16 veces regulado negativamente en 21 de 39 muestras tumorales de pulmón diferentes. Esto parece contradecir los hallazgos en el documento US 2003/0194775 con respecto a la expresión de CLEC14A en tumores de pulmón.

Incyte Genomics, Inc también ha sugerido que CLEC14A era uno de 34 genes asociados a aterosclerosis humana debido a su coexpresión con otros genes ateroscleróticos conocidos (documento WO 01/04264).

Por lo tanto, a pesar del número de sugerencias de posibles funciones y usos de CLEC14A, hasta la presente invención, no ha habido ninguna sugerencia de su papel como un marcador endotelial tumoral, o de que un inhibidor de CLEC14A podría ser un inhibidor de angiogénesis tumoral.

Un primer aspecto de la invención proporciona por lo tanto un procedimiento para inhibir la angiogénesis tumoral en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar al individuo un inhibidor de CLEC14A.

Este aspecto de la invención incluye el uso de un inhibidor de CLEC14A en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis tumoral en un individuo. La invención incluye además un inhibidor de CLEC14A para su uso en la inhibición de la angiogénesis tumoral en un individuo.

Típicamente, el individuo tiene un tumor sólido, que puede tratarse inhibiendo la angiogénesis tumoral, es decir el tumor sólido se asocia con la producción de nuevos vasos sanguíneos. El término "tumor" debe entenderse como referente a todas las formas de crecimiento celular neoplásico, incluyendo, pero sin limitación, tumores de mama, ovario, hígado, vejiga, próstata, riñón, páncreas, estómago, esófago, pulmón y tiroides.

Típicamente, el tumor se asocia con formación de neovasculatura no deseable y el inhibidor de CLEC14A reduce esta en un grado útil. La reducción de la formación de neovasculatura no deseable puede detener la progresión del tumor y puede conducir a una reducción clínicamente útil del tamaño y crecimiento tumoral. Por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis tumoral puede usarse para tratar el tumor, por ejemplo, para prevenir el crecimiento (adicional) del tumor, para prevenir la propagación del tumor (metástasis), o para reducir el tamaño del tumor.

Los inventores han mostrado que CLEC14A se expresa específicamente en el endotelio vascular de una serie de tumores sólidos incluyendo tumores de colon, recto, ovario, hígado, vejiga, próstata, mama, riñón, páncreas, estómago, esófago, pulmón y tiroides. Por lo tanto, en una realización preferida, el individuo tiene un tumor sólido seleccionado de tumores de colon, rectal, ovárico, de hígado, de vejiga, de próstata, de mama, de riñón, de páncreas, de estómago, de esófago, de pulmón y de tiroides.

En una realización específica, el individuo tiene un tumor sólido distinto de un cáncer de pulmón y/o un cáncer rectal.

Preferentemente los procedimientos y medicamentos de la invención se usan para tratar a seres humanos, en cuyo caso el inhibidor de CLEC14A es un inhibidor de CLEC14A humano. Se aprecia, sin embargo, que cuando los procedimientos y medicamentos de la invención son para el tratamiento de mamíferos no humanos, se prefiere que el inhibidor sea específico para el gen/polipéptido de CLEC14A de la otra especie.

CLEC14A

El gen *CLEC14A* (familia del dominio de lectina de tipo C 14, miembro A), que se localiza en 14q21.1, se ha conocido previamente como *C14orf27*, *CEG1* y *EGFR5*. *CLEC14A* codifica un polipéptido de 490 restos de aminoácidos con un PM predicho de 51 kDa. Por el polipéptido CLEC14A se incluye el significado de un producto génico de CLEC14A humano, incluyendo variantes de origen natural del mismo. El polipéptido CLEC14A humano incluye la secuencia de aminoácidos hallada en el N.º de referencia Genbank NP_778230 y variantes de origen natural de la misma. La secuencia polipeptídica de CLEC14A de NP_778230 se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).

Una secuencia de ADNc correspondiente a un ARNm de *CLEC14A* humano se encuentra en el N.º de referencia de Genbank NM_175060 y se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2). La región codificante de este ADNc de NM_175060 es del nucleótido 348 al nucleótido 1820, y esto también se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 3).

CLEC14A es una proteína transmembrana de tipo 1 con un péptido señal en los restos 1-21. El polipéptido humano maduro es de 469 aminoácidos de longitud (restos de aminoácidos 22-490), y contiene una región extracelular de 375 restos (restos 22-396), una región transmembrana (restos 397-425), y una región citoplasmática (restos 426-490). La región extracelular contiene un dominio de tipo lectina de tipo C (restos 32-175) y una región de tipo EGF (restos 245-287).

Inhibidores de CLEC14A

Por un inhibidor de CLEC14A se incluyen ambos inhibidores del polipéptido CLEC14A y del gen/ADNc de CLEC14A.

Los inhibidores adecuados de CLEC14A incluyen anticuerpos que se unen selectivamente a CLEC14A. Otros inhibidores adecuados de CLEC14A incluyen ARNip, polinucleótidos antisentido y moléculas de ribozimas que son específicas para polinucleótidos que codifican el polipéptido CLEC14A, y que evitan su expresión.

Se aprecia que pueden administrarse directamente inhibidores polinucleotídicos de CLEC14A, o pueden administrarse en forma de un polinucleótido que codifica el inhibidor. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, a no ser que el contexto requiera otra cosa, por administrar al individuo un inhibidor de CLEC14A que es un polinucleótido, se incluyen los significados de administrar el inhibidor directamente, o administrar un polinucleótido que codifica el inhibidor, típicamente en forma de un vector. De forma similar, como se usa en el presente documento, a no ser que el contexto requiera otra cosa, por un medicamento o una composición que comprende un inhibidor de CLEC14A que es un polinucleótido, se incluye el significado de que el medicamento o la composición comprenden el inhibidor en sí mismo, o comprende un polinucleótido que codifica el inhibidor.

Anticuerpos

Pueden prepararse anticuerpos adecuados que se unen con CLEC14A, o con partes específicas del mismo, por el experto en la materia usando tecnología de gran tradición en la técnica. Se conocen bien en la técnica procedimientos de preparación de anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos e incluyen tecnología de hibridoma (Kohler y Milstein (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497); presentación de anticuerpos en fagos (Winter y col. (1994) "Making antibodies by phage display technology." Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455); presentación de ribosomas (Schaffitzel y col. (1999) "Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries." J. Immunol. Methods 231: 119-135); y exploración de filtros de colonias por iteraciones (Giovannoni y col. (2001) "Isolation of anti-angiogenesis antibodies from a large combinatorial repertoire by colony filter screening." Nucleic Acids Res. 29: E27). Además, se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención, por ejemplo, en las siguientes publicaciones: "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", Hurrell (CRC Press, 1982); "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", H. Zola, CRC Press, 1987, ISBN: 0-84936-476-0; "Antibodies: A Laboratory Manual" 1ª Edición, Harlow y Lane, Eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1988. ISBN 0-87969-314-2; "Using Antibodies: A Laboratory Manual 2ª Edición, Harlow y Lane, Eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1999. ISBN 0-87969-543-9; y "Handbook of Therapeutic Antibodies" Stefan Dubel, Ed., 1ª Edición, - Wiley-VCH, Weinheim, 2007. ISBN: 3-527-31453-9.

Se prefieren anticuerpos que son especialmente activos en la inhibición de angiogénesis tumoral para agentes terapéuticos antineoplásicos, y pueden seleccionarse para esta actividad usando procedimientos bien conocidos en la técnica y descritos posteriormente.

Por un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A se entiende que la molécula del anticuerpo se une con CLEC14A con una mayor afinidad que por un polipéptido irrelevante, tal como albúmina de suero humano

(HSA). Preferente, el anticuerpo se une con el CLEC14A con al menos 5, al menos 10 o al menos 50 veces más afinidad que por el polipéptido irrelevante. Más preferentemente, la molécula de anticuerpo se une con el CLEC14A con al menos 100, al menos 1.000 o al menos 10.000 veces más afinidad que por el polipéptido irrelevante. Dicha unión puede determinarse por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como uno de los sistemas de Biacore®.

Se prefiere que el anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido de CLEC14A no se una con un polipéptido relacionado, tal como trombomodulina, o que la molécula de anticuerpo se una con CLEC14A con una mayor afinidad que por el polipéptido relacionado tal como trombomodulina. Preferentemente, el anticuerpo se une con el CLEC14A con al menos 5, al menos 10 o al menos 50 veces más afinidad que por el polipéptido relacionado. Más preferentemente, la molécula de anticuerpo se une con el CLEC14A con al menos 100, la menos 1.000 o al menos 10.000 veces mayor afinidad que por el polipéptido relacionado. Dicha unión puede determinarse por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como uno de los sistemas Biacore®.

Se prefiere que los anticuerpos tengan una afinidad por CLEC14A de al menos 10^{-7} M y más preferentemente de 10^{-8} M, aunque pueden preferirse aún más anticuerpos con mayores afinidades, por ejemplo, 10^{-9} M, o mayores.

Típicamente, el anticuerpo que se une selectivamente con el anticuerpo CLEC14A se une con el péptido maduro (restos 22-490) y no con el péptido señal (restos 1-21). En una realización preferida, el anticuerpo que se une selectivamente con CLEC14A se une con la región extracelular de CLEC14A (restos 22-396). El anticuerpo puede unirse con el dominio de tipo lectina de tipo C (restos 32-175) o puede unirse con la región de tipo EGF (restos 245-287).

Por un anticuerpo que se une selectivamente con una parte específica de CLEC14A se entiende que no solamente el anticuerpo se une selectivamente con la diana como se ha descrito anteriormente, sino que la molécula de anticuerpo también se une con la parte específica del CLEC14A con una mayor afinidad que por cualquier otra parte de él. Preferentemente, el anticuerpo se une con la parte específica con al menos 2, al menos 5, al menos 10 o al menos 50 veces mayor afinidad que por cualquier otro epítipo en CLEC14A. Más preferentemente, la molécula de anticuerpo se une con la parte específica con al menos 100, al menos 1.000 o al menos 10.000 veces más afinidad que por cualquier otro epítipo en el CLEC14A. Dicha unión puede determinarse por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como uno de los sistemas de Biacore®. Se prefiere que los anticuerpos tengan una afinidad por su epítipo diana del CLEC14A de al menos 10^{-7} M y más preferentemente de 10^{-8} M, aunque pueden preferirse aún más anticuerpos con mayores afinidades, por ejemplo, 10^{-9} M, o mayores. Preferentemente, el anticuerpo se une selectivamente con el epítipo específico particular dentro del CLEC14A y no se une con ningún otro epítipo dentro de él.

Preferentemente, cuando el anticuerpo se administra a un individuo, el anticuerpo se une con la diana CLEC14A o con la parte específica del mismo con una afinidad mayor que por cualquier otra molécula en el individuo. Preferentemente, el anticuerpo se une con (una parte específica de) el CLEC14A con al menos 2, al menos 5, al menos 10 o al menos 50 veces mayor afinidad que por cualquier otra molécula en el individuo. Más preferentemente, el agente se une con el CLEC14A (en el dominio específico) con al menos 100, al menos 1.000 o al menos 10.000 veces mayor afinidad que cualquier otra molécula en el individuo. Preferentemente, la molécula de anticuerpo se une selectivamente con el CLEC14A sin unirse significativamente con otros polipéptidos en el cuerpo.

La expresión "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión a antígeno del anticuerpo. La expresión también incluye moléculas de tipo anticuerpo que pueden producirse usando técnicas de presentación en fagos u otras técnicas de selección aleatorias para moléculas que se unen con el polipéptido específico o con regiones particulares de él. Por lo tanto, el término anticuerpo incluye todas las moléculas que contienen una estructura, preferentemente una estructura peptídica, que es parte del sitio de reconocimiento (es decir, la parte del anticuerpo que se une o combina con el epítipo o antígeno) de un anticuerpo natural. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, que se conocen ahora bien en la técnica.

Por "moléculas de ScFv" se entienden moléculas en las que los dominios compañeros V_H y V_L están unidos mediante un oligopéptido flexible. Pueden prepararse anticuerpos modificados técnicamente, tales como anticuerpos ScFv usando las técnicas y los enfoques conocidos desde hace tiempo en este campo. Las ventajas de usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos, son múltiples. El menor tamaño de los fragmentos puede conducir a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mejor penetración en el sitio diana. Se eliminan funciones efectoras de anticuerpos completos, tales como unión al complemento. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de los fragmentos. Los anticuerpos completos, y fragmentos F(ab')₂ son "bivalentes". Por "bivalentes" se entiende que los anticuerpos y fragmentos F(ab')₂ tienen dos sitios de combinación de antígenos. Por el contrario, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, teniendo solamente un sitio de combinación de antígenos.

Se aprecia que CLEC14A puede ser una glucoproteína. Por lo tanto, el anticuerpo que se une con CLEC14A puede

unirse con cualquier combinación de la proteína o componentes de carbohidratos de CLEC14A.

Pueden producirse anticuerpos por técnicas convencionales, por ejemplo, por inmunización con el (gluco)polipéptido apropiado o parte o partes del mismo, o usando una biblioteca de presentación en fagos.

5 Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que porta un epítipo o epítipos deseados, opcionalmente haptenizados con otro polipéptido. Dependiendo de la especie huésped, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Se recoge suero del animal inmunizado y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales para el epítipo deseado contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Se conocen bien en este campo técnicas para producir y procesar antisueros policlonales.

15 Están disponibles en el mercado anticuerpos policlonales Anti-CLEC14A, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (N.º de catálogo SAB1400831), R&D Systems (N.º de Catálogo AF4968 y BAF 4968), Abcam (Código de producto ab73087) y Novus Biologicals (N.º de Catálogo H00161198-B01).

20 Un experto en la materia puede también producir fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos contra polipéptidos completos o epítipos particulares de los mismos. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales por hibridomas se conoce bien. Pueden crearse líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Pueden explorarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra los polipéptidos enumerados anteriormente con respecto a diversas propiedades; es decir, con respecto a isotipo y afinidad epitópica. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando cualquiera de las técnicas bien conocidas que posibilita la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo.

25 Se prefiere que el anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal. En algunas circunstancias, particularmente si el anticuerpo va a administrarse repetidas veces a un paciente humano, se prefiere que el anticuerpo monoclonal sea un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado, que sea adecuado para la administración en seres humanos sin generar una respuesta inmunitaria por el ser humano contra la inmunoglobulina administrada. Los anticuerpos no humanos preparados convenientemente pueden "humanizarse" de maneras conocidas, por ejemplo, insertando las regiones CDR de anticuerpos de ratón en el marco conservado de anticuerpos humanos. Pueden prepararse anticuerpos humanizados usando las técnicas y enfoques descritos en Verhoeven y col. (1988) Science, 239, 1534-1536, y en Kettleborough y col., (1991) Protein Engineering, 14(7), 773-783. En algunos casos, los restos de marcos conservados Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. En general, el anticuerpo humanizado contendrá dominios variables en los que todas o la mayoría de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y regiones marco conservadas que son sustancialmente o completamente las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

40 Pueden producirse anticuerpos completamente humanos usando tecnologías recombinantes. Típicamente se usan bibliotecas grandes que comprenden miles de millones de anticuerpos diferentes. A diferencia de las tecnologías previas que emplean quimerización o humanización de, por ejemplo, anticuerpos murinos esta tecnología no se basa en la inmunización de animales para generar el anticuerpo específico. En su lugar las bibliotecas recombinantes comprenden un número enorme de variantes de anticuerpos hechas previamente en las que es probable que la biblioteca tenga al menos un anticuerpo específico para cualquier antígeno. Por lo tanto, usando dichas bibliotecas, puede identificarse un anticuerpo existente que tiene las características de unión deseadas. Para encontrar el buen agente de unión en una biblioteca de una manera eficaz, se han previsto diversos sistemas en los que el fenotipo, es decir, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, está ligado a su genotipo, es decir, el gen codificante. El sistema más habitualmente usado de estos es el denominado sistema de presentación en fagos en el que se expresan fragmentos de anticuerpos presentados como fusiones con proteínas de revestimiento de fagos en la superficie de partículas de fagos filamentosos, portando simultáneamente la información genética que codifica la molécula presentada (McCafferty y col., 1990, Nature 348: 552-554). Los fragmentos de anticuerpos de presentación en fagos específicos para un antígeno particular pueden seleccionarse mediante la unión con el antígeno en cuestión. El fago aislado puede después amplificarse y el gen que codifica los dominios variables de anticuerpos seleccionados puede transferirse opcionalmente a otros formatos de anticuerpo, tales como, por ejemplo, inmunoglobulina de longitud completa y expresarse en cantidades altas usando vectores apropiados y células huéspedes bien conocidas en la técnica. Como alternativa, los anticuerpos "humanos" pueden prepararse inmunizando ratones transgénicos que contienen, en esencia, genes de inmunoglobulina humana (Vaughan y col. (1998) Nature Biotechnol. 16, 535-539).

55 Se aprecia que cuando el anticuerpo es para administración a un individuo no humano, el anticuerpo puede haberse diseñado/producido específicamente para la especie receptora pretendida.

El formato de especificidades de anticuerpo presentadas en partículas de fagos puede diferir. Los formatos más habitualmente usados son Fab (Griffiths y col., 1994. EMBO J, 13: 3245-3260) y monocatenario (scFv) (Hoogenboom

y col., 1992, J Mol Biol. 227: 381-388) que comprenden ambos los dominios de unión a antígeno variable de anticuerpos. El formato monocatenario está compuesto de un dominio pesado variable (V_H) unido a un dominio ligero variable (V_L) mediante un engarce flexible (documento US 4.946.778). Antes de su uso como un agente terapéutico, el anticuerpo puede transferirse a un formato soluble, por ejemplo, Fab o scFv y analizarse como tal. En etapas posteriores el fragmento de anticuerpo que se ha identificado que tiene características deseables puede transferirse a otros formatos más tales como anticuerpos de longitud completa.

El documento WO 98/32845 y Soderlind y col. (2000) Nature BioTechnol. 18: 852-856 describen tecnología para la generación de variabilidad en bibliotecas de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos y derivados de esta biblioteca tienen todos las mismas regiones marco conservadas y solamente difieren en sus CDR. Ya que las regiones marco conservadas son de secuencia de línea germinal se espera que la inmunogenicidad de anticuerpos derivados de la biblioteca, o bibliotecas similares producidas usando la misma tecnología sea particularmente baja (Soderlind y col., 2000). Esta propiedad es muy valiosa para anticuerpos terapéuticos, reduciendo el riesgo de que el paciente forme anticuerpos para el anticuerpo administrado, reduciendo de este modo riesgos de reacciones alérgicas, la aparición de anticuerpos de bloqueo y permitiendo una larga semivida en plasma del anticuerpo. Por tanto, cuando se desarrollan anticuerpos terapéuticos para su uso en seres humanos, se usa ahora la tecnología de biblioteca recombinante moderna (Soderlind y col., 2001, Comb. Chem. & High Throughput Screen. 4: 409-416) preferentemente frente a la tecnología de hibridoma anterior.

Por anticuerpos también se incluyen anticuerpos de cadena pesada estructuralmente derivados de anticuerpos de camélidos tales como Nanobodies® (Ablynx). Estas son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales de anticuerpos de cadena pesada de origen natural. La tecnología de Nanobody® se ha desarrollado después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadenas pesadas contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (C_{H2} y C_{H3}). El dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad de unión a antígeno completa del anticuerpo de cadena pesada original. Estos dominios VHH con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de los Nanobodies®. Combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales (alta especificidad de diana, alta afinidad de diana y baja toxicidad inherente) con características importantes de fármacos de moléculas pequeñas (la capacidad para inhibir enzimas y acceder a hendiduras receptoras). Además, son estables, tienen el potencial de administrarse por un medio distinto de inyección, son más fáciles de manipular, y pueden humanizarse (véase, por ejemplo, documentos US 5.840.526; US 5.874.541; US 6.005.079. US 6.765.087; EP 1 589 107; WO 97/34103; WO97/49805; US 5.800.988; US 5.874. 541 y US 6.015.695).

ARNip

Se describen ARN de interferencia pequeños en Hannon y col., Nature, 418 (6894): 244-51 (2002); Brummelkamp y col., Science 21,21 (2002); y Sui y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 5515-5520 (2002). La interferencia de ARN (ARNi) es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales iniciado por bicatenario (ARNbc) que es homólogo en su secuencia al gen silenciado. Los mediadores de degradación de ARNm específico de secuencia son típicamente ARN de interferencia pequeños (ARNip) de 21 y 22 nucleótidos que, *in vivo*, pueden generarse por escisión por ribonucleasa III a partir de ARNbc más largos. Se ha mostrado que las dobles cadenas de ARNip de 21 nucleótidos suprimen específicamente la expresión de genes tanto endógenos como heterólogos (Elbashir y col. (2001) Nature 411: 494-498). En células de mamífero se considera que el ARNip tiene que estar comprendido por dos 21meros complementarios como se describe posteriormente ya que ARN bicatenarios (bc) más largos activarán PKR (proteína quinasa dependiente de ARNbc) e inhibirán la síntesis proteica general.

Pueden diseñarse fácilmente moléculas de ARNip bicatenarias selectivas para un polinucleótido que codifica el polipéptido CLEC14A por referencia a su secuencia de ADNc. Por ejemplo, se pueden diseñar por referencia a las secuencias de ADNc de CLEC14A en el N.º de referencia de Genbank M_175060 y como se enumera en la **Figura 1**.

Típicamente, se selecciona la primera secuencia de 21 unidades que comienza con un dinucleótido AA que está al menos 120 nucleótidos cadena abajo del codón de metionina iniciador. La secuencia de ARN perfectamente complementaria de esta se convierte en el primer oligonucleótido de ARN. La segunda secuencia de ARN debería ser perfectamente complementaria de los primeros 19 restos de la primera, con un dinucleótido UU adicional en su extremo 3'. Una vez diseñadas, las moléculas de ARN sintéticas pueden sintetizarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

La secuencia de ARNip anti-CLEC14A adecuada se proporciona posteriormente. Además, están disponibles en el mercado ARNip anti-CLEC14A, por ejemplo, de Applied Biosystems (ARNip ID N.º s46248, s46249, s46250, 129879, 129880, 129881) y de Invitrogen (Oligo ID N.º HSS136238, HSS175925 y HSS175926).

Pueden introducirse ARNip en células en el paciente usando cualquier procedimiento adecuado, tal como los descritos en el presente documento. Típicamente, el ARN se protege del ambiente extracelular, por ejemplo, estando contenido dentro de un transportador o vehículo adecuado. Puede usarse transferencia mediada por liposomas, por ejemplo, el procedimiento de oligofectamine.

Polinucleótidos antisentido.

Pueden diseñarse fácilmente moléculas de ácido nucleico antisentido selectivas para un polinucleótido que codifica el polipéptido CLEC14A por referencia a su ADNc o secuencia génica, como se conoce en la técnica. Los ácidos nucleicos antisentido, tales como, oligonucleótidos, son ácidos nucleicos monocatenarios, que pueden unirse específicamente con una secuencia de ácido nucleico complementaria. Uniéndose con la secuencia diana apropiada, se forma una doble cadena ARN-ARN, ADN-ADN, o ARN-ADN. Estos ácidos nucleicos se denominan con frecuencia "antisentido" porque son complementarios de la cadena con sentido o codificante del gen. Recientemente, se ha demostrado que es posible la formación de una triple hélice cuando el oligonucleótido se une con una doble cadena de ADN. Se ha descubierto que los oligonucleótidos podrían reconocer secuencias en el surco principal de la doble hélice de ADN. Se formó de este modo una triple hélice. Esto sugiere que es posible sintetizar moléculas específicas de secuencia que se unen específicamente con ADN bicatenario mediante reconocimiento de sitios de unión a hidrógeno del surco principal. Uniéndose con el ácido nucleico diana, los oligonucleótidos anteriores pueden inhibir la función del ácido nucleico diana. Esto podría, por ejemplo, ser el resultado del bloqueo de la transcripción, procesamiento, adición de poli(A), replicación, traducción o promoción de mecanismos inhibidores de las células, tales como, promoción de la degradación de ARN.

Se preparan oligonucleótidos antisentido en el laboratorio y después se introducen en células, por ejemplo, mediante microinyección o captación del medio de cultivo celular en las células, o se expresan en células después de transfección con plásmidos o retrovirus u otros vectores que portan un gen antisentido. Se descubrió en primer lugar que los oligonucleótidos antisentido inhibían la replicación o expresión viral en cultivo celular para virus del sarcoma de Rous, virus de la estomatitis vesicular, virus del herpes simple de tipo 1, virus de simio y virus de la gripe. Desde entonces, la inhibición de la traducción de ARNm por oligonucleótidos antisentido se ha estudiado exhaustivamente en sistemas sin células incluyendo lisados de reticulocitos de conejo y extractos de germen de trigo. La inhibición de la función viral por oligonucleótidos antisentido se ha demostrado *ex vivo* usando oligonucleótidos que eran complementarios del ARN del retrovirus VIH del SIDA (Goodchild, J. 1988 "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Replication by Antisense Oligodeoxynucleotides", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(15): 5507-11). El estudio de Goodchild ha mostrado que los oligonucleótidos que eran más eficaces eran complementarios de la señal de poli(A); también eran eficaces los dirigidos al extremo 5' del ARN, particularmente el recubrimiento terminal y la región no traducida 5N, junto al sitio de unión de cebadores y en el sitio de unión de cebadores. El recubrimiento terminal, la región traducida 5' y la señal de poli(A) quedan dentro de la secuencia repetida en los extremos del ARN de retrovirus (región R) y los oligonucleótidos complementarios de estos pueden unirse dos veces con el ARN.

Típicamente, los oligonucleótidos antisentido son de 15 a 75 bases de longitud. Por ejemplo, se ha mostrado que oligonucleótidos de 20 unidades inhiben la expresión del ARNm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Witters y col., Breast Cancer Res Treat 53:41-50 (1999)) y se ha mostrado que oligonucleótidos de 25 unidades reducen la expresión de hormona adrenocorticotrópica en más del 90 % (Frankel y col., J Neurosurg 91:261-7 (1999)). Sin embargo, se aprecia que puede ser deseable usar oligonucleótidos con longitudes fuera de este intervalo, por ejemplo 10, 11, 12, 13 o 14 bases, o 36, 37, 38, 39 o 40 bases.

Pueden administrarse de forma sistémica polinucleótidos antisentido. Como alternativa, y preferentemente, la especificidad de unión inherente de los polinucleótidos característicos de formación de pares de bases se potencia limitando la disponibilidad del polinucleótido en su locus pretendido *in vivo*, permitiendo usar dosificaciones menores y minimizando los efectos sistémicos. Por lo tanto, los polinucleótidos pueden aplicarse por vía local al tumor sólido para conseguir el efecto deseado. La concentración de los polinucleótidos en el locus deseado es mucho mayor que si los polinucleótidos se administraran de forma sistémica, y el efecto terapéutico puede conseguirse usando una cantidad total significativamente menor. La alta concentración local de polinucleótidos potencia la penetración de las células diana y bloquea eficazmente la traducción de las secuencias de ácido nucleico diana.

Se apreciará que los agentes antisentido también pueden incluir moléculas mayores que se unen con polinucleótidos (ARNm o genes) que codifican el polipéptido CLEC14A y evitan sustancialmente la expresión de la proteína. Por lo tanto, también se prevén moléculas antisentido que son sustancialmente complementarias del ARNm respectivo.

Las moléculas pueden expresarse a partir de cualquier construcción genética adecuada y suministrarse al paciente. Típicamente, la construcción genética que expresa la molécula antisentido comprende al menos una parte del ADNc de CLEC14A o gen unido operativamente a un promotor que puede expresar la molécula antisentido en la célula. Preferentemente, la construcción genética se adapta para suministro a una célula humana.

Ribozimas

Las ribozimas son ARN o complejos de ARN-proteína que escinden ácidos nucleicos de una manera específica del sitio. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa. Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, escindiendo con frecuencia solamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato oligonucleotídico. Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una mediante interacciones de formación de pares de bases específicas con la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

- Se ha observado catálisis de ribozimas principalmente como parte de reacciones de escisión/ligamiento específicas de secuencia que implican ácidos nucleicos. Por ejemplo, el documento US 5.354.855 indica que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia mayor que la de ribonucleasas conocidas y cercana a la de las enzimas de restricción de ADN. Por lo tanto, la inhibición mediada por ribozimas específicas de secuencia de la expresión génica puede ser particularmente conveniente para aplicaciones terapéuticas, y pueden diseñarse ribozimas específicas para un polinucleótido que codifica el polipéptido CLEC14A por referencia a las secuencias de ADNc enumeradas en el N.º de referencia de Genbank NM_175060 y como se enumera en la Figura 1.
- Se describen en más detalle posteriormente procedimientos y vías de administración de inhibidores polinucleotídicos, tales como, moléculas de ARNip, moléculas antisentido y ribozimas, a un paciente.
- También pueden diseñarse agentes adicionales que inhiban la transcripción de los genes que codifican cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente, por ejemplo, usando un represor de transcripción modificado técnicamente descrito en Isalan y col. (Nat Biotechnol, 19(7): 656-60 (2001)) y en Urnov (Biochem Pharmacol, 64 (5-6): 919 (2002)). Adicionalmente, pueden seleccionarse, por ejemplo, usando los procedimientos de exploración descritos en aspectos posteriores de la presente divulgación.
- 15 Formulaciones y vías de administración
- Se aprecia que el inhibidor de CLEC14A se formulará típicamente para administración a un individuo como una composición farmacéutica, es decir junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Por "farmacéuticamente aceptable" se incluye que la formulación sea estéril y sin pirógenos. Se conocen bien en la técnica de la farmacia vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticos adecuados. El vehículo o los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el inhibidor y no deletéreos para los receptores del mismo. Típicamente, los vehículos serán agua o solución salina que será estéril y sin pirógenos; sin embargo, pueden usarse otros vehículos aceptables.
- En una realización, las composiciones farmacéuticas o formulaciones de la invención son para administración parenteral, más particularmente para administración intravenosa. En una realización preferida, la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa a un paciente, por ejemplo, mediante inyección.
- Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.
- En una realización preferida alternativa, la composición farmacéutica es adecuada para administración tópica a un paciente.
- Preferentemente, la formulación es una dosificación unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.
- El inhibidor puede administrarse por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de ácidos o bases, orgánica, o inorgánica, no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente para tratar, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a diversas dosis.
- En terapia humana, el inhibidor se administrará en general en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica convencional.
- Por ejemplo, el inhibidor puede administrarse por vía oral, por vía bucal, o por vía sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes colorantes o saporíferos, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. El inhibidor también puede administrarse mediante inyección intracavernosa.
- Los comprimidos adecuados pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.
- También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o saporíferos, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de

suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina y combinaciones de los mismos.

5 El inhibidor también puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o puede administrarse por técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer a la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deberían tamponarse de forma adecuada (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La separación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

10 Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición criodesecada (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

15 Para la administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario de un inhibidor habitualmente será de 1 a 1000 mg por adulto (es decir, de aproximadamente 0,015 a 15 mg/kg), administrado en dosis individuales o divididas.

20 Por lo tanto, por ejemplo, los comprimidos o cápsulas del inhibidor pueden contener de 1 mg a 1.000 mg de principio activo para administración individualmente o dos o más cada vez, según sea apropiado. El médico en cualquier caso determinará la dosificación real que será más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se justifiquen intervalos de dosificación mayores o menores y estos están dentro del alcance de la presente invención.

25 El inhibidor también puede administrarse por vía intranasal o por inhalación y se suministra convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador pueden contener una solución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propulsor como el disolvente, que pueden contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo sorbitán trioleato. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo de un anticuerpo y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Dichas formulaciones pueden ser particularmente útiles para tratar tumores sólidos del pulmón, tales como, por ejemplo, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, blastoma pleuropulmonar o tumor carcinoide.

35 Las formulaciones de aerosol o en polvo seco se disponen preferentemente de modo que cada dosis medida o "descarga" contiene al menos 1 mg del inhibidor para suministro al paciente. Se apreciará que la dosis diaria global con un aerosol variará entre pacientes, y puede administrarse en una única dosis o, más habitualmente, en dosis divididas a lo largo del día.

40 Como alternativa, el inhibidor puede administrarse en forma de un supositorio o pesario, particularmente para tratar o dirigirse a tumores de colon, rectales o de próstata.

45 El inhibidor también puede administrar por la vía ocular. Para uso oftálmico, el inhibidor puede formularse como, por ejemplo, suspensiones micronizadas en solución salina estéril, isotónica, de pH ajustado, o, preferentemente, como soluciones en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de bencilalconio. Como alternativa, pueden formularse en una pomada tal como vaselina. Dichas formulaciones pueden ser particularmente útiles para tratar tumores sólidos del ojo, tales como retinoblastoma, meduloepitelioma, melanoma uveal, rdbomiosarcoma, linfoma intraocular o linfoma orbital

50 El inhibidor puede aplicarse por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo de uso externo, o puede administrarse por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. Para aplicación por vía tópica a la piel, el inhibidor puede formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, pueden formularse como una loción o crema adecuada, suspendidos o disueltos en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, ceras de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Dichas formulaciones pueden ser particularmente útiles para tratar tumores sólidos de la piel, tales como, por ejemplo, cáncer de células basales, cáncer de células escamosas o melanoma.

Para cánceres cutáneos, los inhibidores también pueden suministrarse por electroincorporación (EI). Se produce EI

cuando partículas pequeñas de hasta 30 micrómetros de diámetro en la superficie de la de la piel experimentan pulsos eléctricos idénticos o similares a los usados en electroporación. En EI, estas partículas se conducen a través del extracto córneo y a capas más profundas de la piel. Las partículas pueden cargarse o revestirse con inhibidor o pueden simplemente actuar como "balas" que generen poros en la piel a través de los que puede entrar el inhibidor.

- 5 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado. Dichas formulaciones pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de tumores sólidos de la boca y la garganta.
- 10 En una realización, cuando el inhibidor es un polipéptido, tal como un anticuerpo anti-CLEC14A, puede suministrarse usando un sistema de suministro de fármaco de liberación sostenida inyectable. Estos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de las inyecciones. Un ejemplo de dicho sistema es Nutropin Depot que encapsula hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente durante un periodo sostenido.
- 15 El anticuerpo puede administrarse mediante un dispositivo implantado por vía quirúrgica que libera el fármaco directamente en el sitio requerido, por ejemplo, en el ojo para tratar tumores oculares. Dicha aplicación directa en el sitio de enfermedad consigue terapia eficaz sin efectos secundarios sistémicos significativos.

Un procedimiento alternativo para suministro de inhibidores polipeptídicos, tales como anticuerpos, es el sistema inyectable ReGel que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, ReGel es un líquido inyectable mientras que a temperatura ambiente forma inmediatamente un depósito de gel que lentamente se degrada y disuelve en polímeros conocidos, seguros, biodegradables. El fármaco activo se suministra a lo largo del tiempo a media que los biopolímeros se disuelven.

También pueden suministrarse por vía oral productos farmacéuticos polipeptídicos tales como anticuerpos. El proceso emplea un proceso natural para captación oral de vitamina B₁₂ en el cuerpo para cosuministrar proteínas y péptidos. Usando el sistema de captación de vitamina B₁₂, la proteína o el péptido pueden moverse a través de la pared intestinal. Se sintetizan complejos entre análogos de vitamina B₁₂ y el fármaco que conservan tanto afinidad significativa por factor intrínseco (IF) en la parte de vitamina B₁₂ del complejo como bioactividad significativa de la parte farmacológica del complejo.

Pueden administrarse polinucleótidos por cualquier procedimiento eficaz, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular) o por vía oral, nasal y otra que permita que los polinucleótidos accedan al y circulen en el torrente sanguíneo del paciente. Se proporcionan polinucleótidos administrados por vía sistémica preferentemente además de polinucleótidos administrados por vía local, pero también tienen utilidad en ausencia de administración local. Una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 gramos por administración a un ser humano adulto generalmente será eficaz para este fin.

El polinucleótido puede administrarse como una construcción genética adecuada como se describe posteriormente y se suministra al paciente en el que se expresa. Típicamente, el polinucleótido en la construcción genética está unido operativamente con un promotor que puede expresar el compuesto en la célula. Las construcciones genéticas de la invención pueden prepararse usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo en Sambrook y col (2001).

Aunque las construcciones genéticas para suministro de polinucleótidos pueden ser ADN o ARN, se prefiere que sean ADN.

Preferentemente, la construcción genética se adapta para suministro a una célula humana.

Se conocen en la técnica, medios y procedimientos para introducir una construcción genética en una célula en un cuerpo animal. Por ejemplo, las construcciones de la invención pueden introducirse en células por cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo procedimientos que implican retrovirus, de modo que la construcción se inserta en el genoma de la célula. Por ejemplo, en Kuriyama y col (1991, Cell Estruct. and Func. 16, 503-510) se administran retrovirus purificados. Pueden prepararse construcciones de ADN retrovirales que comprenden un polinucleótido como se ha descrito anteriormente usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Para producir retrovirus activos de dicha construcción es habitual usar una línea celular de empaquetamiento de psi2 ecotrópica cultivada en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene suero de ternero fetal (FCS) al 10 %. La transfección de la línea celular es convenientemente por coprecipitación con fosfato cálcico, y se seleccionan transformantes estables mediante la adición de G418 a una concentración final de 1 mg/ml (suponiendo que la construcción retroviral contiene un gen *neo*^R). Se aíslan y expanden colonias independientes y el sobrenadante de cultivo se retira, se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm y se almacena a -70 °C. Para la introducción del retrovirus en células tumorales, por ejemplo, es conveniente inyectar directamente sobrenadante retroviral al que se ha añadido Polybrene 10 µg/ml. Para tumores que superan los 10 mm de diámetro es apropiado inyectar entre 0,1 ml y 1 ml del sobrenadante retroviral; preferentemente 0,5 ml.

Como alternativa, como se describe en Culver y col (1992, Science 256, 1550-1552), pueden inyectarse células que producen retrovirus. Las células productoras de retrovirus introducidas de este modo se modifican técnicamente para producir activamente partículas de vectores retrovirales de modo que se produjo producción continua del vector dentro de la masa tumoral in situ.

- 5 También están disponibles en la invención retrovirus diana; por ejemplo, secuencias que confieren afinidades de unión específicas pueden introducirse por ingeniería genética en genes *env* virales preexistentes (véase Miller y Vile (1995) FASEB J 9, 190-199, para una revisión de este y otros vectores diana para terapia génica).

Otros procedimientos implican el suministro sencillo de la construcción en la célula para expresión en la misma bien durante un tiempo limitado o, después de la integración en el genoma, durante un tiempo más largo. Un ejemplo de este último enfoque incluye liposomas (Nässander y col (1992) Cancer Res. 52, 646-653)

Otros procedimientos de suministro incluyen adenovirus que portan ADN externo mediante un enlace de anticuerpo-poliilisina (véase Curiel (1993) Prog. Med. Virol. 40, 1-18) y conjugados de poliacilación-transferrina como vehículos (Wagner y col (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3.410-3.414). En el primero de estos procedimientos se forma un complejo de poliacilación-anticuerpo con la construcción de ADN u otra construcción genética de la invención, en la que el anticuerpo es específico para adenovirus de tipo silvestre o un adenovirus variante en el que se ha introducido un nuevo epítipo que se une con el anticuerpo. El resto poliacilónico se une con el ADN mediante interacciones electrostáticas con la cadena principal de fosfato. El adenovirus, debido a que contiene proteínas pentónicas y de fibras inalteradas, se internaliza en la célula y transporta a la célula con él la construcción de ADN de la invención. Se prefiere que el poliacilación sea poliilisina.

En un procedimiento alternativo, se emplea un sistema de suministro de ácido nucleico de alta eficacia que usa endocitosis mediada por receptor para transportar macromoléculas de ADN a células. Esto se consigue conjugando la proteína de transporte de hierro transferrina a poliacilaciones que se unen con ácidos nucleicos. La transferrina humana, o la conalbúmina homóloga de pollo, o combinaciones de las mismas se unen covalentemente con la proteína de unión a ADN pequeña protamina o con poliilisinas de diversos tamaños mediante un enlace disulfuro. Estas moléculas de transferrina modificadas mantienen su capacidad para unirse con su receptor afín y para mediar en el transporte de hierro eficaz a la célula. Las moléculas de transferrina-poliacilación forman complejos electroforéticamente estables con construcciones de ADN u otras construcciones genéticas de la invención independientemente del tamaño de ácido nucleico (de oligonucleótidos cortos a ADN de 21 pares de kilobases). Cuando se proporcionan complejos de transferrina-poliacilación y las construcciones de ADN u otras construcciones genéticas de la invención a las células tumorales, se espera un alto nivel de expresión de la construcción en las células.

También puede usarse suministro mediado por receptor de alta eficacia de las construcciones de ADN u otras construcciones genéticas de la invención usando la actividad de alteración de endosomas de partículas adenovirales defectuosas o químicamente inactivadas producidas por los procedimientos de Cotten y col (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6094-6098. Este enfoque parece basarse en el hecho de que se adaptan adenovirus para permitir la liberación de su ADN desde un endosoma sin pase a través del lisosoma, y en presencia de, por ejemplo transferrina unida a la construcción de ADN u otra construcción genética de la invención, la construcción se capta por la célula por la misma vía que la partícula de adenovirus. Este enfoque tiene las ventajas de que no es necesario usar construcciones retrovirales complejas; no hay modificación permanente del genoma como sucede con infección retroviral; y el sistema de expresión diana se acopla con un sistema de suministro diana, reduciendo de este modo la toxicidad a otros tipos celulares.

Se apreciará que "ADN desnudo" y ADN en complejo con lípidos catiónicos y neutros también pueden ser útiles en la introducción del ADN de la invención en células del individuo para tratar. Se describen enfoques no virales para la terapia génica en Ledley (1995, Human Gene Therapy 6, 1129-1144).

Aunque para tumores sólidos de tejidos específicos puede ser útil usar promotores específicos de tejido en los vectores que codifican un inhibidor polinucleotídico, esto no es esencial. Esto se debe a que los genes diana se expresan solamente, o se expresan selectivamente, en el endotelio tumoral. En consecuencia, no se esperaría que la expresión de inhibidores específicos de CLEC14A tales como ARNip, moléculas antisentido y ribozimas en el cuerpo en localizaciones distintas del tumor sólido tuvieran ningún efecto ya que CLEC14A no se expresa o se expresa a un nivel comparativamente bajo. Además, el riesgo de expresión inapropiada de estos inhibidores, en una célula que puede expresar el polipéptido diana a un nivel menor, es minúsculo en comparación con el beneficio terapéutico para un paciente que padece un tumor sólido.

También se conocen sistemas de suministro diana, tales como el sistema de adenovirus modificado descrito en el documento WO 94/10323, en el que, típicamente, el ADN se porta dentro de la partícula de adenovirus, o de tipo adenoviral. Michael y col (1995) Gene Therapy 2: 660-668, describe la modificación de adenovirus para añadir un resto selectivo celular a una proteína de fibra. También son útiles adenovirus mutantes que se replican selectivamente en células tumorales humanas deficientes en p53, tales como las descritas en Bischoff y col (1996) Science 274: 373-376 para suministrar construcciones genéticas a una célula. Otros virus adecuados, vectores virales o partículas de tipo viral incluyen lentivirus y vectores lentivirales, VHS, virus adenoasociados (VAA) y vectores basados en VAA, vaccinia y parvovirus.

Se conocen bien por los expertos en la material procedimientos para suministrar polinucleótidos a un paciente e incluyen el uso de inmunoliposomas, vectores virales (incluyendo vaccinia, vaccinia modificada, adenovirus y vectores virales adenoasociados (VAA)), y por suministro directo de ADN, por ejemplo usando una pistola génica y electroporación. Además, también se conocen bien en la técnica procedimientos para suministrar polinucleótidos a un tejido diana de un paciente para el tratamiento.

Se conocen bien por un experto en la material procedimientos para dirigir y suministrar agentes terapéuticos directamente a regiones específicas del cuerpo.

Por ejemplo, el documento US 6.503.242 describe un aparato de catéter implantado para suministrar agentes terapéuticos directamente al hipocampo. Pueden usarse procedimientos de dirección y suministro de agentes al cerebro para el tratamiento de tumores sólidos del cerebro. En una realización, pueden distribuirse agentes terapéuticos incluyendo vectores a través de una región amplia del SNC mediante inyección en el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo, por punción lumbar (véase, por ejemplo, Kapadia y col (1996) *Neurosurg* 10: 585-587). Como alternativa, puede realizarse suministro preciso del agente terapéutico a sitios específicos del cerebro usando técnicas de microinyección estereotácticas. Por ejemplo, el sujeto que se trata puede colocarse dentro de una base de marco estereotáctico (compatible con IRM) y después capturarse imágenes usando IRM de alta resolución para determinar la situación tridimensional de la región particular para tratar. Las imágenes de IRM pueden después transferirse a un ordenador que tiene el software estereotáctico apropiado, y se usan varias imágenes para determinar un sitio diana y trayectoria para microinyección del agente terapéutico. El software traduce la trayectoria en coordenadas tridimensionales que se registran con precisión para el marco estereotáctico. En el caso de suministro intracraneal, se expondrá el cráneo, se taladrarán orificios circulares sobre el sitio de entrada, y se usará el aparato estereotáctico para situar la aguja y asegurar la implantación a una profundidad predeterminada. El agente terapéutico puede suministrarse a regiones del SNC tales como el hipocampo, células de la médula espinal, tronco encefálico (médula, puente troncoencefálico y mesencéfalo), cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (cuerpo estriado, corteza cerebral o dentro de la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o combinaciones de los mismos. En otra realización, el agente terapéutico se suministra usando otros procedimientos de suministro adecuados para suministro localizado, tales como permeación localizada de la barrera hematoencefálica. El documento US 2005/0025746 describe sistemas de suministro para suministro localizado de un vector de virus adenoasociado (VAA) que codifica un agente terapéutico a una región específica del cerebro.

Cuando un agente terapéutico para el tratamiento de un tumor sólido de, por ejemplo, el cerebro, está codificado por un polinucleótido, puede ser preferible que su expresión esté bajo el control de un promotor específico de tejido adecuado. Se usan preferentemente promotores específicos del sistema nervioso central (SNC), tales como promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos (Byrne y Ruddle (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5473-5477) y promotores específicos de la glía (Morii y col (1991) *Biochem Biophys Res Commun*: 175: 185-191) para dirigir la expresión de un polinucleótido preferentemente en células del SNC. Preferentemente, el promotor es específico de tejido y está esencialmente no activo fuera del sistema nervioso central, o la actividad del promotor es mayor en el sistema nervioso central que en otras células o tejidos. Por ejemplo, el promotor puede ser específico para la médula espinal, el tronco encefálico (médula, puente troncoencefálico y mesencéfalo), cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (cuerpo estriado, corteza cerebral o dentro de la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o combinaciones de los mismos. El promotor puede ser específico para tipos celulares particulares, tales como neuronas o células de la glía en el SNC. Si está activo en células de la glía, puede ser específico para astrocitos, oligodendrocitos, células ependimales, células de Schwann o microglía. Si está activo en neuronas, puede ser específico para tipos particulares de neuronas, por ejemplo, neuronas motoras, neuronas sensoriales o interneuronas. El promotor puede ser específico para células en regiones particulares del cerebro, por ejemplo, la corteza, el cuerpo estriado, la sustancia negra y el hipocampo.

Los promotores específicos neuronales adecuados incluyen, pero sin limitación, enolasa específica de neuronas (NSE; Olivia y col (1991) *Genómica* 10: 157-165); n.º de referencia de GenBank: X51956), y promotor de cadena ligera de neurofilamento humano (NEFL; Rogaev y col (1992) *Hum Mol Genet* 1: 781); n.º de referencia de GenBank: L04147). Los promotores específicos de la glía incluyen, pero sin limitación, promotor de la proteína de ácido fibrilar de la glía (GFAP) (Morii y col (1991); n.º de referencia de GenBank: M65210), promotor S100 (Morii y col (1991); n.º de referencia de GenBank: M65210) y promotor de glutamina sintasa (Van den y col (1991) *Biochem Biophys Acta* 2: 249-251); n.º de referencia de GenBank: X59834). En una realización preferida, el gen está flanqueado cadena arriba (es decir, 5') por el promotor de enolasa específica de neuronas (NSE). En otra realización preferida, el gen de interés está flanqueado cadena arriba (es decir, 5') por el promotor de factor de elongación 1 alfa (EF). Un promotor específico del hipocampo que podría usarse es el promotor del gen de receptor de glucocorticoides específico del hipocampo (GR).

Como alternativa, para el tratamiento de tumores sólidos del corazón, Svensson y col. (1999) describe el suministro de genes recombinantes a cardiomiocitos por inyección intramiocárdica o infusión intracoronaria de vectores cardioprotectores, tales como vectores de virus adenoasociados recombinantes, dando como resultado la expresión transgénica en cardiomiocitos murinos *in vivo* (Svensson y col (1999) "Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors". *Circulation*. 99: 201-5). Melo y col revisan terapias basadas en genes y células para enfermedad cardíaca (Melo y col (2004) "Gene and cell-based therapies for heart disease". *FASEB J.* 18(6): 648-63). Una vía de

administración preferida alternativa es mediante un catéter o estent. Los estents representan una alternativa atractiva para suministro génico localizado, ya que proporcionan una plataforma para elución génica prolongada y transducción eficaz de paredes arteriales opuestas. Esta estrategia de suministro génico tiene el potencial de reducir la propagación sistémica de los vectores virales y por lo tanto una respuesta inmunitaria del huésped reducida. Los revestimientos de estent tanto sintéticos como de origen natural han mostrado potencial para permitir la elución génica prolongada sin reacción adversa significativa (Sharif y col (2004) "Current status of catheter- and stent-based gene therapy." Cardiovasc Res. 64(2): 208-16).

Puede ser deseable poder regular temporalmente la expresión del inhibidor polinucleotídico en la célula, aunque esto no es esencial por las razones indicadas anteriormente. Por lo tanto, puede ser deseable que la expresión del polinucleótido esté directa o indirectamente (véase posteriormente) bajo el control de un promotor que puede regularse, por ejemplo mediante la concentración de una molécula pequeña que puede administrarse al paciente cuando se desee activar o, más probablemente, reprimir (dependiendo de si la molécula pequeña efectúa la activación o represión de dicho promotor) la expresión del anticuerpo del polinucleótido. Esto puede ser particularmente beneficioso si la construcción de expresión es estable, es decir, capaz de expresar el inhibidor (en presencia de cualquier molécula reguladora necesaria), en la célula durante un periodo de al menos una semana, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho meses o uno o más años. Por lo tanto el polinucleótido puede unirse operativamente con un promotor regulable. Los ejemplos de promotores regulables incluyen los indicados en los siguientes artículos: Rivera y col (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(15), 8657-62 (control por rapamicina, un fármaco oralmente biodisponible, usando dos vectores de adenovirus o virus adenoasociados (VAA) separados, uno que codifica un gen diana de la hormona del crecimiento humana inducible (hGH), y el otro un factor de transcripción regulado por rapamicina bipartito); Magari y col (1997) J Clin Invest 100 (11), 2865-72 (control por rapamicina); Bueler (1999) Biol Chem 380 (6), 613-22 (revisión de vectores virales adenoasociados); Bohl y col (1998) Blood 92 (5), 1512-7 (control por doxiciclina en vector adenoasociado); Abruzzese y col (1996) J Mol Med 74 (7), 379-92 (revisión de factores de inducción, por ejemplo hormonas, factores de crecimiento, citocinas, citostáticos, irradiación, choque térmico y elementos sensibles asociados).

Para uso veterinario, el inhibidor se administra típicamente como una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que será más apropiada para un animal particular.

Terapia de combinación

De acuerdo con una nota de prensa del Instituto Nacional del Cáncer fechada el 14 de abril de 2005, actualizada el 16 de junio de 2005 ("Bevacizumab Combined With Chemotherapy Improves Progression-Free Survival for Patients With Advanced Breast Cancer"), el anticuerpo monoclonal anti-VEGF inhibidor de angiogénesis bevacizumab mejora el resultado clínico para varios tumores sólidos cuando se administra en combinación con quimioterapia convencional. Las combinaciones que se han usado incluyen bevacizumab en combinación con irinotecán, fluorouracilo y leucovorina; bevacizumab en combinación con FOLFOX4 (un régimen de oxaliplatino, 5-fluorouracilo y leucovorina); bevacizumab en combinación con paclitaxel y bevacizumab en combinación con paclitaxel y carboplatino.

Se aprecia por lo tanto que aunque los inhibidores de CLEC14A descritos anteriormente pueden ser clínicamente eficaces en ausencia de cualquier otro compuesto antineoplásico, puede ser ventajoso administrar estos inhibidores junto con un agente antineoplásico adicional.

En consecuencia, en una realización, el procedimiento también puede comprender administrar al individuo al menos un agente antineoplásico adicional. El procedimiento puede comprender administrar al individuo una composición farmacéutica que contiene el inhibidor de CLEC14A y el agente antineoplásico adicional. Sin embargo, se aprecia que el inhibidor de CLEC14A y el agente antineoplásico adicional pueden administrarse por separado, por ejemplo por vías separadas de administración. Por lo tanto se aprecia que el inhibidor de CLEC14A y el al menos un agente antineoplásico adicional pueden administrarse secuencialmente o (sustancialmente) simultáneamente. Pueden administrarse dentro de la misma formulación farmacéutica o el mismo medicamento o pueden formularse y administrarse por separado.

En una realización de los usos médicos, el medicamento que contiene el inhibidor de CLEC14A también puede comprender al menos un agente antineoplásico adicional.

En otra realización de los usos médicos, el individuo para tratar puede ser uno al que se administra al menos un agente antineoplásico adicional. Se aprecia que puede administrarse al individuo el agente antineoplásico adicional al mismo tiempo que el medicamento que contiene el inhibidor de CLEC14A, aunque puede haberse administrado al individuo (o se le administrará) el agente antineoplásico adicional antes (o después) de recibir el medicamento que contiene el inhibidor de CLEC14A.

El agente antineoplásico adicional puede seleccionarse de agentes alquilantes incluyendo mostazas de nitrógeno tales como mecloretamina (HN₂), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina, tiotepa; alquil sulfonatos tales como busulfán; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); y triacenos tales

como decarbacina (DTIC; dimetoltriacenoimidazol-carboxamida); antimetabolitos incluyendo análogos de ácido fólico tales como metotrexato (ametofterina); análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUDR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina); productos naturales incluyendo alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorrubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como alfenomas de interferón; agentes misceláneos incluyendo complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (*cis*-DDP) y carboplatino; antracénodiona tales como mitoxantrona y antraciclina; urea sustituida tal como hidroxiaurea; derivados de metil hidracina de metilo tales como procarbocina (N-metilhidracina, MIH); y supresores adrenocorticales tales como mitotano (*o*, *p*'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos/derivados; inhibidores del ciclo celular; inhibidores de proteosoma tales como bortezomib (Velcade®); inhibidores de transductasa de señal (por ejemplo tirosina quinasa) tales como imatinib (Glivec®), inhibidores de COX-2, y agonistas/antagonistas de hormonas tales como flutamida y tamoxifeno.

Los agentes antineoplásicos usados en la clínica se agrupan típicamente por mecanismo de acción: agentes alquilantes, inhibidores de Topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, antimetabolitos de ARN/ADN, antimetabolitos de ADN y agentes antimitóticos. El sitio web del Instituto Nacional del Cáncer/NIH de Estados Unidos enumera 122 compuestos (http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/search-es/standard_mechanism.html), todos los cuales pueden usarse junto con un inhibidor de CLEC14A. Incluyen agentes alquilantes incluyendo Asaley, AZQ, BCNU, busulfán, carboxifalato platino, CBDCA, CCNU, CHIP, clorambucilo, clorotocina, *cis*-platino, clomesona, cianomorfolino-doxorrubicina, ciclodisona, dianhidrogalactitol, fluorodopán, hepsulfam, hicantona, melfalán, metil CCNU, mitomicina C, mitozolamida, mostaza de nitrógeno, PCNU, piperazina, piperazindiona, pipobromán, porfiromicina, mostaza de espirohiantoína, teroxirona, tetraplatino, picoplatino (SP-4-3) (*cis*-aminodicloro (2-metilpiridina) Pt (II)), tiotepa, trietilenmelamina, mostaza de nitrógeno de uracilo, Yoshi-864; agentes antimitóticos incluyendo alocolchicina, Halicondrina B, colchicina, derivado de colchicina, dolastatina 10, maitansina, rizoxina, taxol, derivado de taxol, tiocolchicina, tritil cisteína, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina; inhibidores de topoisomerasa I incluyendo camptotecina, camptotecina, sal de Na, aminocamptotecina, 20 derivados de camptotecina, morfolinodoxorrubicina; inhibidores de topoisomerasa II incluyendo doxorrubicina, amonafida, m-AMSA, derivado de antrapirazol, pirazoloacridina, bisantreno HCL, daunorrubicina, desoxidoxorrubicina, mitoxantrona, menogarilo, N,N-dibenzil daunomicina, oxantrazol, rubidazona, VM-26, VP-16; antimetabolitos de ARN/ADN incluyendo L-alanosina, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, acivicina, 3 derivados de aminopterina, un antifol, antifol soluble en Baker, dicloralil lawsona, brequinar, florafur (profármaco), 5,6-dihidro-5-azacitidina, metotrexato, derivado de metotrexato, N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA), pirazofurina, trimetrexato; antimetabolitos de ADN incluyendo 3-HP, 2'-desoxi-5-fluorouridina, 5-HP, alfa-TGDR, glicinato de afidicolina, ara-C, 5-aza-2'-desoxicitidina, beta-TGDR, ciclocitidina, guanazol, hidroxiaurea, glicodialdehído de inosina, macbecina II, pirazoloimidazol, tioguanina y tiopurina.

Se prefiere, sin embargo, que el al menos un agente antineoplásico adicional se seleccione de cisplatino; carboplatino; picoplatino; 5-fluorouracilo; paclitaxel; mitomicina C; doxorrubicina; gemcitabina; tomudex; pemetrexed; metotrexato; irinotecán, fluorouracilo y leucovorina; oxaliplatino, 5-fluorouracilo y leucovorina; y paclitaxel y carboplatino.

Cuando se ha mostrado que el agente antineoplásico adicional es particularmente eficaz para un tipo tumoral específico, puede preferirse que el inhibidor de CLEC14A se use en combinación con ese agente antineoplásico adicional para tratar ese tipo tumoral específico.

Suministro dirigido de agentes citotóxicos

Una vía para el desarrollo de fármacos antineoplásicos más selectivos, y por lo tanto mejores, es el suministro dirigido de moléculas bioactivas al ambiente tumoral por medio de moléculas de unión (por ejemplo, anticuerpos humanos) que son específicas para marcadores endoteliales tumorales. Debido a su accesibilidad y a las opciones terapéuticas que permiten (por ejemplo, coagulación sanguínea intraluminal o reclutamiento de células inmunitarias), los marcadores vasculares expresados selectivamente en vasos sanguíneos tumorales están adaptados idealmente para estrategias de dirección tumoral basadas en ligandos, permitiendo la captura de imágenes de neovasculatura tumoral y la dirección de agentes citotóxicos a la neovasculatura tumoral.

En consecuencia, un segundo aspecto de la invención proporciona un procedimiento para dirigir un agente citotóxico a neovasculatura tumoral en el cuerpo de un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto citotóxico.

Este aspecto de la invención también proporciona el uso de un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto citotóxico en la preparación de un medicamento para dirigir un agente citotóxico a neovasculatura tumoral en el cuerpo de un individuo. Este aspecto proporciona además dicho compuesto para uso en la dirección de un agente citotóxico a neovasculatura tumoral en el cuerpo de un individuo.

Típicamente, el resto citotóxico se selecciona de un agente quimioterapéutico directamente citotóxico, un polipéptido

directamente citotóxico, un resto que es capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico, un radiosensibilizador, un ácido nucleico directamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido directa o indirectamente citotóxico o un átomo radiactivo. Se proporcionan ejemplos de dichos restos citotóxicos, así como procedimientos para preparar los conjugados que comprenden el anticuerpo y el resto citotóxico, en las publicaciones anteriores de los inventores WO 02/36771 y WO2004/046191.

El resto citotóxico puede ser directa o indirectamente tóxico para células en neovasculatura o células que están en proximidad estrecha a y asociadas con neovasculatura. Por "directamente citotóxicos" se incluye el significado de que el resto es uno que por sí mismo es citotóxico. Por "indirectamente citotóxico" se incluye el significado de que el resto es uno que, aunque no es en sí mismo citotóxico, puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, mediante su acción en una molécula adicional o por acción adicional en ella.

En una realización el resto citotóxico es un agente quimioterapéutico citotóxico. Se conocen bien en la técnica agentes quimioterapéuticos citotóxicos. Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos, tales como agentes antineoplásicos, incluyen los enumerados en el presente documento.

Varios de estos restos citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos citotóxicos, se han unido previamente a anticuerpos y otros agentes de dirección, y por lo tanto el experto en la materia puede preparar fácilmente compuestos de la invención que comprenden estos agentes. Por ejemplo, puede usarse conjugación de carbodiimida (Bauminger y Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159) para conjugar una diversidad de agentes, incluyendo doxorubicina, con anticuerpos. También pueden usarse otros procedimientos para conjugar un resto citotóxico con un anticuerpo. Por ejemplo, puede usarse oxidación de peryodato sódico seguida de alquilación reductora de reactivos apropiados, así como reticulación de glutaraldehído. Se conocen en la técnica procedimientos de reticulación de polipéptidos y se describen en el documento WO 2004/046191. Sin embargo, se reconoce que, independientemente de qué procedimiento para producir un compuesto de la invención se seleccione, debe realizarse una determinación de que el anticuerpo mantiene su capacidad de dirección y de que el resto unido mantiene su función relevante.

En una realización adicional de la invención, el resto citotóxico puede ser un resto peptídico o polipeptídico citotóxico por el que se incluye cualquier resto que conduzca a muerte celular. Se conocen bien en la técnica restos peptídicos y polipeptídicos citotóxicos e incluyen, por ejemplo, ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, factor tisular y similares. También se conocen en la técnica procedimientos para unirlos con restos de dirección tales como anticuerpos. El uso de ricina como un agente citotóxico se describe en Burrows y Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000, y el uso de factor tisular, que conduce a coagulación sanguínea localizada e infarto de un tumor, se ha descrito en Ran y col (1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653 y Huang y col (1997) *Science* 275, 547-550. Tsai y col (1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074 describe la cadena A de abrina conjugada con un anticuerpo monoclonal. Otras proteínas de inactivación de ribosomas se describen como agentes citotóxicos en el documento WO 96/06641. También puede usarse exotoxina de *Pseudomonas* como el resto polipeptídico citotóxico (Aiello y col. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461).

Ciertas citocinas, tales como TNF, INF γ e IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos.

Ciertos átomos radiactivos también pueden ser citotóxicos si se suministran en dosis suficientes. Por lo tanto, el resto citotóxico puede comprender un átomo radiactivo que, en su uso, suministra una cantidad suficiente de radiactividad al sitio diana para ser citotóxico. Los átomos radiactivos adecuados incluyen fósforo 32, yodo 125, yodo 131, indio 111, renio 186, renio 188 o itrio 90, o cualquier otro isótopo que emita suficiente energía para destruir células cercanas, orgánulos o ácido nucleico. Preferentemente, los isótopos y la densidad de átomos radiactivos en el compuesto de la invención son tales que se suministra una dosis de más de 4000 cGy (preferentemente al menos 6000, 8000 o 10000 cGy) al sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y sus orgánulos, particularmente el núcleo.

El átomo radiactivo puede unirse con el anticuerpo de maneras conocidas. Por ejemplo EDTA u otro agente quelante puede unirse con anticuerpo y usarse para unir ^{111}In o ^{90}Y . Los restos de tirosina pueden estar marcados con ^{125}I o ^{131}I .

El resto citotóxico puede ser un radiosensibilizador. Los radiosensibilizadores incluyen fluoropirimidinas, análogos de timidina, hidroxurea, gemcitabina, fludarabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamida, etanixadol, pimonidazol y misonidazol (véase, por ejemplo, McGinn y col (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1193-1203; Shewach y Lawrence (1996) *Invest. New Drugs* 14, 257-263; Horsman (1995) *Acta Oncol.* 34, 571-587; Shenoy y Singh (1992) *Clin. Invest.* 10, 533-551; Mitchell y col (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 827-836; Iliakis y Kurtzman (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 1235-1241; Brown (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 987-993; Brown (1985) *Cancer* 55, 2222-2228).

El resto citotóxico puede ser un factor procoagulante, tal como el dominio extracelular del factor tisular (Rippmann y col (2000) "Fusion of the tissue factor extracellular domain to a tumour stroma specific single-chain fragment variable antibody results in an antigen-specific coagulation-promoting molecule". *Biochem J.* 349: 805-812; Huang y col (1997) "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature". *Science.* 275(5299): 547-550).

El resto citotóxico puede ser un polipéptido indirectamente citotóxico. En una realización particularmente preferida, el polipéptido indirectamente citotóxico es un polipéptido que tiene actividad enzimática y puede convertir un profármaco

relativamente no tóxico en un fármaco citotóxico. Cuando el resto de dirección es un anticuerpo este tipo de sistemas se denominan con frecuencia ADEPT (Terapia de Profármaco Enzimático Dirigida a Anticuerpo). El sistema requiere que el resto de dirección localice la parte enzimática en el sitio deseado en el cuerpo del paciente (por ejemplo el sitio de nuevo tejido vascular asociado con un tumor) y después de permitir tiempo para que la enzima se localice en el sitio, administrar un profármaco que es un sustrato para la enzima, siendo el producto final de la catálisis un compuesto citotóxico. El objeto del enfoque es maximizar la concentración de fármaco en el sitio deseado y minimizar la concentración de fármaco en tejidos normales (Senter y col (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531-2; y Bagshawe, y col (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" Br. J. Cancer. 58, 700-703); Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230 y el documento WO 2004/046191, describen diversas combinaciones de enzimas/profármacos que pueden ser adecuadas en el contexto de la presente invención.

Típicamente, el profármaco es relativamente no tóxico en comparación con el fármaco citotóxico. Típicamente, tiene menos del 10 % de la toxicidad, preferentemente menos del 1 % de la toxicidad como se mide en un ensayo citotóxico *in vitro* adecuado.

Es probable que el resto que sea capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico esté activo en aislamiento del resto del compuesto pero es necesario solamente que esté activo cuando (a) esté en combinación con el resto del compuesto y (b) el compuesto esté unido con, adyacente a o internalizado en células dianas.

El resto adicional puede ser uno que se hace citotóxico, o libera un resto citotóxico, tras irradiación. Por ejemplo, el isótopo boro 10, cuando se irradia de forma apropiada, libera partículas que son citotóxicas (documento US 4.348.376; Primus y col (1996) Bioconjug Chem 7: 532-535.)

De forma similar, el resto citotóxico puede ser uno que es útil en terapia fotodinámica tal como fotofrina (véase, por ejemplo, Dougherty y col (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

Las preferencias para el individuo para tratar, los tipos de tumor sólido, las vías de administración, el anticuerpo, y así sucesivamente, son como se ha definido anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención.

Se aprecia que la dirección de un agente citotóxico a neovasculatura tumoral actuará para inhibir la neoangiogénesis tumoral. En consecuencia, un tercer aspecto de la invención proporciona un procedimiento para inhibir la angiogénesis tumoral en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto citotóxico, como se ha definido anteriormente con respecto al segundo aspecto de la invención. El tercer aspecto también proporciona el uso de un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto citotóxico en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis tumoral en un individuo. Este aspecto proporciona además dicho compuesto para su uso en la inhibición de la angiogénesis tumoral en un individuo. Las preferencias para el individuo para tratar, los tipos de tumor sólido, las vías de administración, el anticuerpo, y así sucesivamente, son como se ha definido anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención.

También se aprecia que la dirección de un resto citotóxico a neovasculatura tumoral para inhibir la neoangiogénesis tumoral como se ha descrito en los segundo y tercer aspectos de la invención puede ser clínicamente eficaz en ausencia de cualquier otro compuesto antineoplásico, puede ser no obstante ventajoso administrar los compuestos junto con un agente antineoplásico adicional. En consecuencia, en una realización de los segundo y tercer aspectos de la invención, el procedimiento puede comprender administrar al individuo un agente antineoplásico adicional. Las preferencias para el agente antineoplásico adicional para administrar son como se ha descrito anteriormente. El compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto citotóxico y el agente antineoplásico adicional puede administrarse en forma de una composición farmacéutica que contiene ambos de estos componentes. Sin embargo, se aprecia que el compuesto y el agente antineoplásico adicional, pueden administrarse por separado, por ejemplo por vías de administración separadas. Por lo tanto se aprecia que el compuesto y el al menos un agente antineoplásico adicional pueden administrarse secuencialmente o (sustancialmente) de forma simultánea. Pueden administrarse dentro de la misma formulación farmacéutica o el mismo medicamento o pueden formularse y administrarse por separado.

Captura de imágenes, detección y diagnóstico de tumores

Los anticuerpos que se unen selectivamente con el polipéptido CLEC14A, cuando se une con un resto detectable, pueden ser útiles en la captura de imágenes, por ejemplo captura de imágenes vasculares de tumores. Se describen procedimientos y compuestos útiles en la captura de imágenes vasculares de tumores en la publicación anterior de los inventores WO 02/36771.

Puede usarse un compuesto que comprende un anticuerpo anti CLEC14A como se ha definido anteriormente y un resto detectable, en combinación con un procedimiento de detección apropiado, para detectar la localización del compuesto en el individuo, y por lo tanto para identificar los sitios y el alcance de la angiogénesis tumoral en el individuo.

En consecuencia, un cuarto aspecto de la invención proporciona un procedimiento para capturar imágenes de neovasculatura tumoral en el cuerpo de un individuo comprendiendo el procedimiento administrar al individuo un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto detectable, y capturar imágenes del resto detectable en el cuerpo.

- 5 En una realización, el procedimiento puede comprender además la etapa de detectar la localización del compuesto en el individuo.

Por un "resto detectable" se incluye el significado de que el resto es uno que, cuando se localiza en el sitio diana después de la administración del compuesto de la invención en un paciente, puede detectarse, típicamente de forma no invasiva desde fuera del cuerpo, y localizarse el sitio de la diana. Por lo tanto, los compuestos de este aspecto de la invención son útiles en la captura de imágenes y diagnóstico, especialmente en la captura de imágenes y diagnóstico de neovasculatura de tumores sólidos.

Típicamente, el resto detectable es o comprende una nanopartícula magnética, un radionúclido o un fluoróforo.

Por lo tanto, en una realización, el resto detectable puede ser un átomo radiactivo que es útil en la captura de imágenes. Los átomos radiactivos adecuados incluyen tecnecio 99m o yodo 123 para estudios escintigráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de espín para captura de imágenes por resonancia magnética (IRM), tales como yodo 123 de nuevo, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, el compuesto de la invención debe tener suficiente de los isótopos atómicos apropiados para que la molécula sea detectable.

El radiomarcador u otro marcador pueden incorporarse en el compuesto de maneras conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo puede biosintetizarse o sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Por ejemplo, pueden unirse marcadores tales como ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹⁸⁶Rh, ¹⁸⁸Rh y ¹¹¹In, mediante restos de cisteína en el anticuerpo. El itrio 90 puede unirse mediante un resto de lisina. Puede usarse el procedimiento de lodogen (Fraker y col (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) para incorporar yodo 123. La referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J. F. Chatal, CRC Press, 1989) describe otros procedimientos en detalle.

Se conocen bien en la técnica muchos procedimientos de detección y fluoróforos adecuados y se describen, por ejemplo, en Stefan Andersson-Engels y col (1997) "In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. Phys. Med. Biol. 42: 815-824; Altinoglu y col (2008) "Near-Infrared Emitting Fluorophore-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles for In Vivo Imaging of Human Breast Cancer" ACS Nano 2(10): 2075-84; y Chin y col (2009) "In-vivo optical detection of cancer using chlorin e6 - polyvinylpyrrolidone induced fluorescence imaging and spectroscopy" BMC Medical Imaging 9:1 (doi:10.1186/1471-2342-9 1).

Típicamente, el individuo tiene un tumor sólido, preferentemente tal como los descritos anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención, y se capturan imágenes de la neovasculatura del tumor sólido. Por lo tanto, la localización del anticuerpo en un órgano particular en el cuerpo indica que el individuo puede tener o puede desarrollar un tumor sólido en ese órgano. Este procedimiento puede ser útil, por ejemplo, en la determinación del tamaño de un tumor sólido previamente diagnosticado, determinación de la eficacia de una terapia contra el tumor sólido, o determinación del alcance de la metástasis del tumor. Se conocen bien en la técnica procedimientos para capturar imágenes de un resto detectable en el cuerpo, e incluyen PET (tomografía de emisión de positrones).

En consecuencia, este aspecto de la invención proporciona un procedimiento para detectar, diagnosticar o pronosticar un tumor sólido en un individuo, comprendiendo el procedimiento:

administrar al individuo un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto detectable, y detectar la presencia y/o localización del resto detectable en el cuerpo.

Las preferencias para el anticuerpo, el compuesto y el resto detectable son como se ha descrito anteriormente.

45 Otras condiciones angiogénicas

Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, no se ha sugerido nunca previamente que un inhibidor de CLEC14A sea un inhibidor de la angiogénesis. También se aprecia que la inhibición de la angiogénesis puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o afecciones angiogénicas distintas de tumores. Se proporciona por lo tanto de acuerdo con un quinto aspecto de la invención un procedimiento para inhibir la angiogénesis en un individuo que lo necesite que comprende administrar un inhibidor de CLEC14A al individuo.

Además de tumores, la inhibición de la angiogénesis también puede ser útil para combatir cualquier enfermedad o afección que implique angiogénesis no deseada, indeseable o inapropiada. Dichas condiciones incluyen psoriasis, menorragia, endometriosis, artritis (tanto inflamatoria como reumatoide), degeneración macular, enfermedad de Paget, retinopatía y sus complicaciones vasculares (incluyendo proliferativas y del prematuro, y retinopatía diabética), proliferación vascular benigna, fibrosis, obesidad e inflamación. En consecuencia, este aspecto de la invención incluye

un procedimiento para tratar estas enfermedades o afecciones administrando un inhibidor de CLEC14A a un individuo que lo necesite. La invención también proporciona el uso de un inhibidor de CLEC14A en la preparación de un medicamento para tratar estas enfermedades o afecciones. Estas enfermedades o afecciones se asocian con formación de neovasculatura no deseable y típicamente el inhibidor de CLEC14A reduce esto en un grado útil.

- 5 Por "inhibir la angiogénesis" se incluye el significado de reducir la tasa o el nivel de la angiogénesis. La reducción puede ser una reducción de nivel bajo de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 % o aproximadamente 40 % de la tasa o el nivel de angiogénesis. Preferentemente, la reducción es una reducción de nivel medio de aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % de reducción de la tasa o el nivel de angiogénesis. Más preferentemente, la reducción es una reducción de alto nivel de
- 10 aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 99,99 % de la tasa o el nivel de la angiogénesis. Más preferentemente, la inhibición también puede incluir la eliminación de la angiogénesis o su reducción hasta un nivel indetectable. Se conocen en la técnica procedimientos y ensayos para determinar la tasa o el nivel de la angiogénesis, y por lo tanto para determinar si un inhibidor de CLEC14A inhibe la angiogénesis, y en qué grado, y se describen en el presente documento.
- 15 La terapia (el tratamiento) puede ser en seres humanos o animales. Preferentemente, los procedimientos de las invenciones se usan para tratar a seres humanos.

Las preferencias para el inhibidor de CLEC14A, formulaciones y vías de administración etc. son como se ha definido anteriormente.

Procedimientos ex vivo

- 20 Un sexto aspecto de la invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para inhibir la angiogénesis, comprendiendo el procedimiento administrar un inhibidor de CLEC14A a tejido o células *ex vivo*. Típicamente, este procedimiento *ex vivo* para inhibir la angiogénesis se lleva a cabo en el contexto de un ensayo de angiogénesis o en un modelo de angiogénesis tumoral, tal como los descritos posteriormente. Por lo tanto las células pueden ser líneas celulares tumorales establecidas o células tumorales que se han retirado de un individuo. El tejido o las células son preferentemente tejido o células de mamífero, y más preferentemente son tejido o células humanas. Preferentemente,
- 25 el tejido o las células comprenden endotelio tumoral, o son un modelo de endotelio tumoral. Las preferencias para el inhibidor de CLEC14A son como se ha descrito anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención.

- Los ensayos de angiogénesis adecuados incluyen ensayos con respecto a proliferación, migración e invasión de células endoteliales, e incluyen el sistema de angiogénesis para invasión de células endoteliales BD BioCoat™ que está disponible como n.º de catálogo 354141 y 354142 de BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU. Los modelos adecuados de angiogénesis tumoral incluyen ensayos con respecto a migración de células endoteliales tumorales, incluyendo migración inducida por bFGF y VEGF, proliferación de células endoteliales tumorales, e invasión de células endoteliales tumorales y ensayos de anillo aórtico.
- 30

Exploración

- 35 Un séptimo aspecto desvela un procedimiento para identificar un agente que puede ser útil en el tratamiento de un tumor sólido, o un compuesto candidato para la identificación de un agente que puede ser útil en el tratamiento de un tumor sólido, comprendiendo el procedimiento:

- proporcionar un compuesto candidato que se une con el polipéptido CLEC14A, o un fragmento del mismo; y ensayar el compuesto candidato en un ensayo de angiogénesis,
- 40 en el que un compuesto candidato que inhibe la angiogénesis en el ensayo puede ser un agente que es útil en el tratamiento de un tumor sólido, o puede ser un compuesto candidato para la identificación de un agente que es útil en el tratamiento de un tumor sólido.

En un aspecto, el procedimiento comprende además la etapa precedente de determinar si el compuesto candidato se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A, o un fragmento del mismo.

- 45 Se aprecia que estos procedimientos pueden usarse para identificar un factor antiangiogénico, que puede ser un agente antineoplásico.

- Por un polipéptido CLEC14A se incluye un polipéptido que tiene la secuencia enumerada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), y variantes de origen natural de la misma. Se aprecia que para el ensayo de unión, no es necesario usar un polipéptido que tenga 100 % de identidad de secuencia con la secuencia del polipéptido CLEC14A enumerada en la
- 50 Figura 1 (bien sobre el polipéptido de longitud completa o bien el fragmento del mismo). En consecuencia, en este aspecto de la invención, es posible usar un polipéptido que tenga al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, aún más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 % o al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de CLEC14A enumerada en la Figura 1 (bien sobre el polipéptido de longitud completa o bien sobre el fragmento del mismo). Se prefiere que el polipéptido variante tenga una región consecutiva de al menos 20 restos de aminoácidos, más preferentemente al
- 55 menos 50 restos, de la secuencia del polipéptido CLEC14A enumerada en la Figura 1. Dichas variantes pueden

prepararse, por ejemplo, usando los procedimientos de tecnología de ADN recombinante, ingeniería proteica y mutagénesis dirigida que se conocen bien en la técnica.

El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse usando programas informáticos adecuados, por ejemplo el programa GAP del Grupo de Informática Genética de la Universidad de Wisconsin y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con polipéptidos cuya secuencia se ha alineado de forma óptima. El alineamiento puede llevarse a cabo como alternativa usando el programa Clustal W (Thompson y col., (1994) *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80). Los parámetros usados pueden ser los siguientes: parámetros de alineamiento por pares rápido: tamaño K-tuple (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización de hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Procedimiento de puntuación: x por ciento. Múltiples parámetros de alineamiento: penalización de hueco abierto; 10, penalización de extensión de hueco; 0,05. Matriz de puntuación: BLOSUM.

También se aprecia que para determinar si un compuesto candidato se une con un polipéptido específico, no es necesario usar el polipéptido de longitud completa entero en el ensayo de unión, y pueden emplearse de forma útil fragmentos del polipéptido. Preferentemente, el fragmento es de al menos 20 restos de aminoácidos de longitud, y puede ser de entre 20 y 50 restos o entre 50 y 100 restos o entre 100 y 150 restos o entre 150 y 200 restos de longitud, o más. Se prefiere que el fragmento sea un fragmento de, o que el fragmento contenga, el dominio extracelular del polipéptido CLEC14A maduro.

En una realización, el compuesto candidato puede ser un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A, o un fragmento del mismo. Se han descrito anteriormente anticuerpos adecuados.

En otra realización, el compuesto candidato puede ser un péptido. Los péptidos adecuados que se unen con el polipéptido CLEC14A, o un fragmento del mismo, pueden identificarse por procedimientos tales como presentación en fagos de bibliotecas peptídicas (Scott y Smith (1990) "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science* 249: 386-390; Felici y col (1995) "Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage." *Biotechnol. Annu. Rev.* 1: 149-183); y Collins y col (2001) "Cosmix-plexing: a novel recombinatorial approach for evolutionary selection from combinatorial libraries." *J. Biotechnol.* 74: 317-338); incluyendo selección *in vivo* (Pasqualini y col (1997) "αv integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnol.* 15: 542-546), y síntesis en paralelo en fase sólida (Frank (2002) "The SPOT-synthesis technique. *Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications*". *J. Immunol. Methods* 267: 13-26; y Pinilla y col (2003) "Advances in the use of synthetic combinatorial chemistry: mixture-based libraries". *Nature Med.* 9: 118-122). Las constantes de disociación de los péptidos están típicamente en el intervalo micromolar, aunque puede mejorarse la avididad por multimerización (Tersikh y col (1997) "Peptabody": a new type of high avidity binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 1663-1668; y Wrighton y col (1997) "Increased potency of an erythropoietin peptide mimetic through covalent dimerization. *Nature Biotechnol.* 15, 1261-1265).

Los ligandos primarios de lectinas de tipo C son carbohidratos, incluso aunque se ha mostrado unión de otras proteínas, lípidos o compuestos inorgánicos. Por lo tanto, en otra realización, el compuesto candidato puede ser un carbohidrato, o una molécula que contiene restos de carbohidratos tales como una glucoproteína o un glucolípido. Se aprecia que el reconocimiento y la unión de carbohidratos con lectinas de tipo C dependen del calcio. Por lo tanto, en esta realización, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de iones de calcio.

En otra realización más, el compuesto candidato puede ser un aptámero, es decir, una molécula de ADN monocatenaria que se pliega en una estructura de unión al ligando específica. Los aptámeros adecuados que se unen con el polipéptido CLEC14A, o un fragmento del mismo, pueden identificarse por procedimientos tales como selección y amplificación *in vitro* (Ellington y Szostak (1992) "Selection in vitro of single stranded DNA molecules that fold into specific ligand binding structures". *Nature* 355: 850-852; y Daniels y col (2003) "A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 15416-15421). El aptámero puede ser un "Spiegelmer" estable frente a nucleasas (Helmling y col (2004) "Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 13174-13179). Los aptámeros típicamente tienen constantes de disociación en el intervalo micromolar al subnanomolar.

En otra realización más, el compuesto candidato puede ser una molécula orgánica pequeña. La molécula pequeña adecuada que se une con el polipéptido de CLEC14A, o un fragmento del mismo, puede identificarse por procedimientos tales como exploración de bibliotecas grandes de compuestos (Beck-Sickinger y Weber (2001) *Combinational Strategies in Biology and Chemistry* (John Wiley & Sons, Chichester, Sussex)); mediante relación de estructura-actividad por resonancia magnética nuclear (Shuker y col (1996) "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 274: 1531-1534); bibliotecas químicas de autoensamblaje codificadas (Melkko y col (2004) "Encoded self-assembling chemical libraries." *Nature Biotechnol.* 22: 568-574); química con molde de ADN (Gartner y col (2004) "DNA-templated organic synthesis and selection of a library of macrocycles. *Science* 305: 1601-1605); química combinatoria dinámica (Ramstrom y Lehn (2002) "Drug discovery by dynamic combinatorial libraries". *Nature Rev. Drug Discov.* 1: 26-36); unión (Arkin y Wells (2004) "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nature Rev. Drug Discov.* 3: 301-317); y exploración de velocidad (Muckenschnabel y col (2004) "SpeedScreen: label-free liquid chromatography-mass spectrometry-based high-through-put screening for the discovery of orphan protein ligands". *Anal. Biochem.* 324: 241-249). Típicamente, las moléculas orgánicas pequeñas tendrán una constante de disociación para el polipéptido en el intervalo nanomolar,

particularmente para antígenos con cavidades. Los beneficios de la mayoría de agentes de unión de moléculas orgánicas pequeñas incluyen su facilidad de fabricación, falta de inmunogenicidad, propiedades de distribución tisular, estrategias de modificación química y biodisponibilidad oral.

5 La capacidad de un compuesto candidato para unirse o interactuar con el polipéptido CLEC14A o fragmento del mismo puede medirse por cualquier procedimiento para detectar/medir una interacción proteína/proteína u otra interacción compuesto/proteína, como se analiza adicionalmente posteriormente. Los procedimientos adecuados incluyen procedimientos tales como, por ejemplo, interacciones de dos híbridos de levadura, copurificación, ELISA, coimmunoprecipitación y procedimientos de resonancia de plasmón superficial. Por lo tanto, el compuesto candidato puede considerarse capaz de unirse con el polipéptido o fragmento del mismo si puede detectarse una interacción entre el compuesto candidato y el polipéptido o fragmento del mismo por ELISA, coimmunoprecipitación o procedimientos de resonancia de plasmón superficial o mediante un procedimiento de interacción de dos híbridos de levadura o copurificación. Se prefiere que la interacción pueda detectarse usando un procedimiento de resonancia de plasmón superficial. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos de resonancia de plasmón superficial. Se describen técnicas, por ejemplo, en O'Shannessy DJ (1994) "Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature" Curr Opin Biotechnol. 5(1): 65-71; Fivash y col (1998) "BIAcore for macromolecular interaction". Curr Opin Biotechnol. 9(1): 97-101; Malmqvist (1999) "BIAcore: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions". Biochem Soc Trans. 27(2): 335-40.

20 Se aprecia que se prefieren particularmente ensayos de exploración que son capaces de actuar con alto rendimiento. Los ejemplos pueden incluir ensayos basados en células y ensayos de unión de proteína-proteína. Puede usarse un sistema basado en SPA (ensayo de proximidad de centelleo; Amersham International). Por ejemplo, puede realizarse un ensayo para identificar un compuesto capaz de modular la actividad de una proteína quinasa de la siguiente manera. Pueden prepararse perlas que comprenden agente de centelleo y un polipéptido sustrato que pueden fosforilarse. Las perlas pueden mezclarse con una muestra que comprende la proteína quinasa y ^{32}P -ATP o ^{33}P -ATP y con el compuesto de ensayo. Convenientemente esto se realiza en un formato de multipocillo (por ejemplo, de 96 o 25 384). La placa se recuenta después usando un contador de centelleo adecuado, usando parámetros conocidos para ensayos de ^{32}P o ^{33}P SPA. Solamente se detectan ^{32}P o ^{33}P que están en proximidad al agente de centelleo, es decir, solamente los unidos al polipéptido. También pueden usarse variantes de dicho ensayo, por ejemplo en las que el polipéptido se inmoviliza en las perlas de centelleo mediante unión con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

30 Otros procedimientos para detectar interacciones polipéptido/polipéptido incluyen ultrafiltración con procedimientos de HPLC/espectroscopia de masas de pulverización iónica u otros procedimientos físicos y analíticos. Pueden usarse procedimientos de Transferencia de Resonancia de Energía de Fluorescencia (FRET), por ejemplo, bien conocido por los expertos en la materia, en los que la unión de dos entidades marcadas con fluorescencia pueden medirse midiendo la interacción de los marcadores fluorescentes cuando están en proximidad estrecha entre sí.

35 Un procedimiento adicional para identificar un compuesto que es capaz de unirse con el polipéptido CLEC14A o fragmento del mismo es uno en el que el polipéptido se expone al compuesto y se detecta y/o se mide cualquier unión del compuesto con dicho polipéptido. Puede determinarse la constante de unión para la unión del compuesto con el polipéptido CLEC14A. Los expertos en la materia conocen bien procedimientos adecuados para detectar y/o medir (cuantificar) la unión de un compuesto con un polipéptido y pueden realizarse, por ejemplo, usando un procedimiento capaz de actuar a alto rendimiento, por ejemplo un procedimiento basado en microplacas. La tecnología, denominada VLSIPS™, ha permitido la producción de microplacas extremadamente pequeñas que contienen cientos de miles o 40 más de sondas moleculares diferentes. Estas microplacas biológicas o matrices tienen sondas dispuestas en matrices, cada sonda asignada a una localización específica. Se han producido microplacas biológicas en las que cada localización tiene una escala de, por ejemplo, diez micrómetros. La microplacas pueden usarse para determinar si las moléculas diana interaccionan con cualquiera de las sondas en la microplaca. Después de exponer la matriz a moléculas diana en condiciones de ensayo seleccionadas, los dispositivos de exploración pueden examinar cada localización en la matriz y determinar si una molécula diana ha interaccionado con la sonda en esa localización. 45

Se aprecia que la identificación de un compuesto candidato que se une con el polipéptido CLEC14A o fragmento del mismo puede ser una etapa inicial en la ruta de exploración de fármacos, y los compuestos identificados pueden seleccionarse adicionalmente por ejemplo con respecto a la capacidad para inhibir la angiogénesis. 50

Por "inhibir la angiogénesis" se incluye el significado de reducir la tasa o el nivel de angiogénesis. La reducción puede ser una reducción de nivel bajo de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 % o aproximadamente 40 % de la tasa o el nivel de angiogénesis. Preferentemente, la reducción es una reducción de nivel medio de aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % de reducción de la tasa o el nivel de angiogénesis. Más preferentemente, la reducción es una reducción de nivel alto de aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 99,9 % o aproximadamente 99,99 % de la tasa o el nivel de angiogénesis. Más preferentemente, la inhibición también puede incluir la eliminación de angiogénesis o su reducción hasta un nivel indetectable. 55

Se conocen en la técnica procedimientos y ensayos para determinar la tasa o el nivel de angiogénesis, y por lo tanto para determinar si un compuesto de ensayo inhibe la angiogénesis, y en qué grado. Por ejemplo, el documento US 60

6.225.118, describe un ensayo *ex vivo* multicelular para modelar los estadios combinados de angiogénesis concretamente los estadios de proliferación, migración y diferenciación de desarrollo celular. El AngioKit, n.º de Catálogo ZHA-1000, de TCS CellWorks Ltd, Buckingham MK18 2LR, Reino Unido, es un modelo adecuado de angiogénesis humana para analizar las propiedades antiangiogénicas de compuestos. La tasa o el nivel de angiogénesis pueden determinarse también usando el ensayo de anillo aórtico y el ensayo de angiogénesis de esponja que se conocen bien en la técnica.

También son útiles como ensayos de angiogénesis ensayos para proliferación, migración e invasión de células endoteliales. Un experto en la materia conoce ensayos adecuados para proliferación y migración de células endoteliales y se describen en el presente documento. Un experto en la materia conoce también ensayos adecuados para invasión de células endoteliales e incluyen el Sistema de Angiogénesis para Invasión de Células Endoteliales BD BioCoat™ que está disponible como n.º de Catálogo 354141 y 354142 de BD Biosciences, Bedford, MA, Estados Unidos.

También se considera que un compuesto candidato que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A puede inhibir la migración de células endoteliales tumorales, incluyendo migración inducida por bFGF y VEGF, inhibir la proliferación de células endoteliales tumorales, o la invasión de células endoteliales tumorales. En consecuencia, los compuestos candidatos que muestran actividad inhibitoria en el ensayo de migración de HUVEC, o que muestran actividad antiproliferativa, o que muestran actividad antiinvasiva en un ensayo tal como el Sistema de angiogénesis para invasión de células endoteliales BD BioCoat™ (BD Biosciences, Bedford, MA, Estados Unidos), pueden ser terapéuticamente útiles para combatir tumores sólidos en los que la migración, proliferación o invasión de células endoteliales tumorales contribuyen a la angiogénesis de la neovascularización y por lo tanto a la patología de tumores sólidos.

Se aprecia que estos procedimientos pueden ser procedimientos de exploración de fármacos, una expresión bien conocida por los expertos en la materia, y el compuesto candidato puede ser un compuesto de tipo farmacológico o compuesto candidato para el desarrollo de un compuesto de tipo farmacológico.

La expresión “compuesto de tipo farmacológico” se conoce bien por los expertos en la materia, y puede incluir el significado de un compuesto que tiene características que pueden hacerlo adecuado para su uso en medicina, por ejemplo como el principio activo en un medicamento. Por lo tanto, por ejemplo, un compuesto de tipo farmacológico puede ser una molécula que puede sintetizarse por las técnicas de química orgánica, menos preferentemente por técnicas de biología molecular o bioquímica, y es preferentemente una molécula pequeña, que puede ser de menos de 5.000 Dalton y que puede ser soluble en agua. Un compuesto de tipo farmacológico puede mostrar adicionalmente características de interacción selectiva con una proteína o proteínas particulares y estar biodisponible y/o ser capaz de penetrar membranas celulares diana o la barrera hematoencefálica, pero se apreciará que estas características no son esenciales.

La expresión “compuesto candidato” se conoce bien de forma similar por los expertos en la materia, y puede incluir el significado de que el compuesto, aunque no es en sí mismo adecuado para su uso como un fármaco (por ejemplo porque es solamente débilmente potente contra su diana pretendida, no selectivo en su acción, inestable, poco soluble, difícil de sintetizar o tiene escasa biodisponibilidad) puede proporcionar un punto de partida para el diseño de otros compuestos que pueden tener características más deseables.

En un aspecto, el compuesto identificado se modifica, y el compuesto modificado se ensaya con respecto a la capacidad para inhibir la angiogénesis. Se han descrito anteriormente ensayos adecuados para la inhibición de angiogénesis.

Se aprecia que los procedimientos de exploración pueden usarse para identificar agentes que pueden ser útiles para combatir tumores sólidos. Por lo tanto, los procedimientos de exploración preferentemente también comprenden la etapa adicional de ensayar el compuesto identificado o el compuesto modificado con respecto a eficacia en un modelo animal de cáncer, particularmente un tumor sólido. Se conocen en la técnica modelos adecuados e incluyen implantes subcutáneos de carcinoma de pulmón de Lewis en ratones (homoinjerto en ratones Black 57) o implantes subcutáneos de xenoinjertos HT29 en ratones desnudos.

La divulgación puede comprender la etapa adicional de sintetizar y/o purificar el compuesto identificado o el compuesto modificado. La invención puede comprender además la etapa de formular el compuesto en una composición farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos también pueden someterse a otros ensayos, por ejemplo ensayos de toxicología o metabolismo, como se conoce bien por los expertos en la materia.

Por lo tanto la divulgación incluye un procedimiento para preparar un compuesto antineoplásico que puede ser útil en el tratamiento de un tumor sólido, comprendiendo el procedimiento identificar un compuesto usando los procedimientos de exploración descritos anteriormente y sintetizando, purificando y/o formulando el compuesto identificado.

La divulgación también incluye un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende la etapa de mezclar el compuesto identificado usando los procedimientos descritos anteriormente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La enumeración o el análisis de un documento aparentemente previamente publicado en la presente memoria descriptiva no debería interpretarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.

La invención se describirá ahora en más detalle en referencia a los siguientes ejemplos y figuras.

10 Figura 1: A: secuencia polipeptídica de CLEC14A humano del n.º de referencia de Genbank NP_778230 (SEQ ID NO: 1). B: ADNc de CLEC14A humano del n.º de referencia de Genbank NM_175060 (SEQ ID NO: 2). C: región codificante de ADNc de CLEC14A humano de las posiciones 348-1820 de NM_175060 (SEQ ID NO: 3).

Figura 2: Una gráfica que muestra la expresión relativa de CLEC14A en HUVEC y otras células primarias. CLEC14A se expresó específicamente en células endoteliales (HUVEC), y no en células de músculo liso aórtico humano (HASM), fibroblastos de pulmón humano (MRC5), células epiteliales bronquiales humanas (HBE), hepatocitos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

15 Figura 3: hibridación in situ de ortólogo de CLEC14A en embrión de pez cebra 24 horas después de la fertilización. El ortólogo de CLEC14A de pez cebra se expresa en la aorta dorsal, vena cardinal, y en vasos intersomáticos.

Figura 4: captura de imágenes por fluorescencia in vivo de fusión de CLEC14A-GFP de longitud completa en células CHO. La fusión CLEC14A-GFP se localiza en la membrana celular y se concentra en filopodios y microespículas, con el mismo patrón observado en HUVEC.

20 Figura 5: captura de imágenes confocal de la expresión de CLEC14A y colocalización con VE-cadherina en HUVEC confluyentes. CLEC14A se expresa en las uniones celulares y se colocaliza con VE-cadherina.

25 Figura 6: transferencia de Western de reducción de expresión por ARNip de CLEC14A en HUVEC. La doble cadena 1 tiene la secuencia de GAACAAGACAATTTCAGTAA (SEQ ID NO: 4) y la doble cadena 2 tiene la secuencia CAATCAGGGTCGACGAGAA (SEQ ID NO: 5). El oligonucleótido "mezclado" es de Eurogentech, y consiste en ARNip no dirigido cuya secuencia no se presenta. El polipéptido no glucosilado se ve en aproximadamente 60 kDa y la proteína glucosilada madura en aproximadamente 100 kDa

Figura 7: captura de imágenes confocal de reducción por ARNip de la expresión de CLEC14A en HUVEC, sin ningún efecto en la expresión de VE-cadherina.

30 Figura 8: (A) imagen de microscopía óptica de los resultados de ensayo de curación de heridas por rasguño de HUVEC con reducción de la expresión por ARNip, que muestra un retardo del cierre de la herida después de la reducción de la expresión de CLEC14A por dos dobles cadenas de ARNip (A). (B) Representación gráfica de los resultados de (A).

35 Figura 9: (A) imagen de microscopía óptica de los resultados del ensayo de curación de heridas por rasguño de HUVEC con anticuerpos policlonales anti CLEC14A, que muestra de nuevo un retardo del cierre de la herida. (B) Representación gráfica de los resultados de (A).

Figura 10: PCR en tiempo real de HUVEC en condiciones de tensión de corte y estáticas. Los ARNm tanto de ROBO4 como de CLEC14A están regulados negativamente con tensión de corte laminar (2Pa).

40 Figura 11: análisis de inmunofluorescencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de tumor ovárico, de vejiga, de hígado y de mama humano. La expresión de CLEC14A se restringió al endotelio en todos los tejidos tumorales analizados.

Figura 12: análisis de inmunofluorescencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de tumor de colon, rectal y vejiga (x2) humano. La expresión de CLEC14A se restringió al endotelio en todos los tejidos tumorales analizados.

Figura 13: análisis de inmunofluorescencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de tumor de esófago, riñón y pulmón humano. La expresión de CLEC14A se restringió al endotelio en todos los tejidos tumorales analizados.

45 Figura 14: análisis de inmunofluorescencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de tumor de próstata, estómago, pancreático y tiroideos humano. La expresión de CLEC14A se restringió al endotelio en todos los tejidos tumorales analizados.

Figura 15: análisis de inmunofluorescencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de cerebro, corazón y riñón humanos normales. La expresión de CLEC14A no se detectó en ninguno de los tejidos normales analizados.

50 Figura 16: (A) imagen de microscopía óptica de los resultados de un ensayo de curación de heridas por rasguño de HUVEC con anticuerpo monoclonal anti CLEC14A CRT-3 que muestra un retardo del cierre de la herida. (B)

Representación gráfica de los resultados de (A).

Figura 17: (A) imagen de microscopía óptica de los resultados de un ensayo de curación de heridas por rasguño de SEND con anticuerpo monoclonal anti CLEC14A CRT-2 que muestra un retardo del cierre de la herida. (B) Representación gráfica de los resultados de (A).

5 Ejemplo 1: Estudios experimentales en CLEC14A

Objetivos

Se llevaron a cabo varios experimentos para caracterizar la expresión y función de CLEC14A.

Materiales y procedimientos

Preparación y cultivo de HUVEC

10 Se aislaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) de cordones umbilicales donados por el Servicio Nacional de Salud del Reino Unido después del consentimiento informado de los donantes. Los cordones se diseccionaron de placentas y la vena se lavó en PBS estéril para retirar la sangre. Se inyectó 1 mg/ml de colagenasa diluida en medio M199 (Sigma) en la vena y después se incubó a 37 °C durante 20 minutos para separar las células endoteliales. Se recogieron HUVEC lavando en medio completo M199 que contenía FCS 10 %, complemento de crecimiento celular endotelial de vasos grandes 10 % (TCS Cell Works), y L-glutamina 4 mM, y se sembraron en 15 gelatina de Tipo 1 0,1 % de placas recubiertas con piel porcina (Sigma).

Fuente de células primarias

20 Se obtuvieron células de músculo liso aórtico humano (HASMC) y células epiteliales bronquiales humanas (HBE) de TCS Cell Works. Se obtuvieron fibroblastos de pulmón humano (MRC5) de Cancer Research UK Central Services. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) del Instituto de Estudios de Cáncer en la Universidad de Birmingham. Los hepatocitos fueron un regalo del profesor David Adams, Escuela de Inmunidad e Infeción, Universidad de Birmingham.

Extracción de ARN y PCR en tiempo real

25 Se aisló ARN total de células primarias en cultivo usando el reactivo TRI (Sigma) seguido de síntesis de ADNc usando un kit de Archivo de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) con cebadores aleatorios proporcionados. Se empleó sistema de ensayo de PCR en tiempo real ProbeLibrary (Exiqon) en la exploración de células primarias de la expresión de CLEC14A. Se seleccionó Flotilina 2 como el gen constitutivo con respecto al que se normalizó la expresión de CLEC14A. Los conjuntos de cebador y sonda para CLEC14A y Flotilina 2 se diseñaron por software ProbeFinder (Roche). Para CLEC14A, el conjunto de cebador y sonda fue:

30 5'-CTGGGACCGAGGTGAGTG-3' (SEQ ID NO: 6), y
5'-CGCGATGCAAGTAACTGAGA-3' (SEQ ID NO: 7), con el número de sonda 24.

Para Flotilina 2, el conjunto de cebador y sonda fue:

5'-TGTTGTGGTTCGACTATAAACAG-3' (SEQ ID NO: 8), y
5'-GGGCTGCAACGTCATAATCT-3' (SEQ ID NO: 9), con el número de sonda 28.

35 Se realizaron reacciones de PCR cuantitativa en el termociclador Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research). Se preparó una mezcla de reacción por triplicado para cada tipo celular primario y se aplicaron 5 ng de ADNc en cada reacción. El factor de cambio se calculó usando el procedimiento de $\Delta\Delta CT$.

Hibridación in situ y RT-PCR de pez cebra

40 Se amplificó el ortólogo de pez cebra de ADNc de CLEC14A humano (NM_199786.1, zgc: 66439) a partir de una preparación de ADNc 24 horas después de la fertilización (hpf) usando cebadores zClec14A:

Directo: 5'-GGAGAAAAAGCAGACAATATCATTTTA-3' (SEQ ID NO: 10), e
Inverso: 5'-AGTCTCTCTCACTTAGGTTTCTCTTT-3' (SEQ ID NO: 11).

45 Se clonó un fragmento de PCR de 1172 pb generado por estos cebadores en pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) siguiendo los protocolos del fabricante. El clon zClec14A se secuenció para verificar su identidad. Se generaron sondas de ARN con sentido y antisentido marcadas con digoxigenina para hibridación in situ se por transcripción *in vitro* usando un kit de marcaje de ARN (Roche). Para generar una sonda con sentido el plásmido se linealizó con *KpnI* y se transcribió con T7. La linealización del plásmido con *XhoI* y transcripción con SP6 generó la sonda antisentido. Se llevó a cabo hibridación in situ siguiendo el procedimiento de Thisse y Thisse (2008) "High-resolution in situ hybridisation to whole-mount zebrafish embryos". Nat. Protoc. 3: 59-69. "

50

Para analizar el patrón temporal de la expresión de zClec14A, se preparó ARN de diversos estadios del desarrollo del pez cebra usando reactivo Trizol (Invitrogen). Se preparó ADNc usando transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y hexámeros aleatorios (Fermentas). Se amplificó zClec14A usando las siguientes condiciones (Tm 55 °C, 26 ciclos) y cebadores zClec14A:

- 5 Directo: 5'-AAACCTAAGTGAGAGAGACTGTGC-3' (SEQ ID NO: 12), y
 Inverso: 5'-ACAGAGTACGCTATTTTCATCCATC-3' (SEQ ID NO: 13). Se usó factor de elongación-1α (EF1α) como un control de carga, y se amplificó usando los siguientes cebadores de EF1 a (Thisse y Thisse (2008)):
 Directo: 5'-CACCTGGGAGTGAAACA-3' (SEQ ID NO: 14), y
 Inverso: 5'-ACTTGCAGGCGATGTGAGC-3' (SEQ ID NO: 15).

10 Inmunofluorescencia de HUVEC

Se cultivaron HUVEC en cámaras de micropocillos de vidrio (Nunc) fijadas en metanol helado, se lavaron con PBST bloqueado en FCS 10 %, BSA 3 % en PBST. Las células se tiñeron después con anticuerpo de CLEC14A siguiendo el mismo protocolo usado para secciones incluidas en parafina o coteñidas con anticuerpo IgG monoclonal de ratón 5 µg/ml contra VE-cadherina humana, amablemente donado por la profesora Maria Grazia Lampugnani, Instituto Firc para Oncología Molecular, Milán. Se analizó la tinción de las secciones con un microscopio confocal de exploración por láser 510 (Carl Zeiss).

15 Fusión de CLEC14A-GFP y transfección de células CHO

Se obtuvo CLEC14A de longitud completa en vector pCMV-SPORT6 de MGC. La secuencia se subclonó en un vector TOPO (Invitrogen) y después en vector pEGFP-N1 (Invitrogen). Se sembraron 10⁵ células CHO en placas y se cultivaron en DMEM (Invitrogen) que contenía FCS 10 % y glutamina 4 mM. 48 horas después de la siembra, se transfectaron células subconfluentes con pEGFP-N1 que contenía CLEC14A de longitud completa usando Fugene6 (Roche) a la relación de 6:1. La mezcla de transfección se añadió al cultivo celular durante 24 horas y después se reemplazó con DMEM sin suero. Las células se analizaron 72 horas después de la transfección usando un sistema de microscopio fluorescente en vivo Axioscope 2 Plus (Zeiss) y se adquirieron imágenes con una cámara a color AxioCam (Zeiss).

20 Diseño de ARNip de CLEC14A-GFP y silenciamiento de CLEC14A en HUVEC

Se sembraron 2,5 x 10⁵ HUVEC en placas de 6 pocillos el día antes de la transfección. Se usaron dos dobles cadenas de ARNip diferentes para CLEC14A, GAACAAGACAATTCAGTAA (doble cadena 1, SEQ ID NO: 4) y CAATCAGGGTTCGACGAGAA (doble cadena 2, SEQ ID NO: 5) (Eurogentech) y se usaron junto con dobles cadenas de control negativo. La transfección se realizó usando lipofectamine RNAiMax 0,3 % (Invitrogen) y dobles cadenas 10 nM en OptiMEM (Invitrogen). La mezcla de transfección se incubó con las células durante 4 horas antes de reemplazar con medio completo M199 normal. Las células se usaron después de 48 horas de transfección y se evaluó la reducción de la expresión proteica mediante transferencia de Western. Se aisló proteína usando tampón de lisis NP40 y se cuantificó usando el ensayo de proteínas Dc de BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante (BioRad). Se cargaron cantidades iguales de proteína en cada carril y se separaron mediante SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se exploraron usando 0,2 ng/ml de anticuerpo policlonal IgG anti CLEC14A humano de oveja (R & D System) y 0,2 µg/ml de anticuerpo secundario policlonal anti oveja de conejo conjugado con HRP (Abcam). Se exploró la misma mancha de transferencia con 1 ng/ml de anticuerpo primario monoclonal de ratón antitubulina y 1 µg/ml de anticuerpo secundario policlonal de cabra anti ratón conjugado con HRP.

25 Ensayo de curación de heridas por rasguño con ARNip

Se sembraron 2,5 x 10⁵ HUVEC en placas de 6 pocillos el día antes de la transfección. A las 48 horas después de la transfección se realizó un rasguño con una punta de pipeta de 20 µl. Se evaluó la migración quimiocinética de HUVEC adquiriendo imágenes del cierre de la herida en los momentos cero, 4, 8, 12 y 24 horas con un microscopio óptico Leica DM 1000 y una cámara Xli 2 M USB 2.0. El área abierta de la herida se destacó y se calculó con software analizador de IQ celular.

30 Ensayo de curación de heridas por rasguño con antisueros de CLEC14A

Se realizó un rasguño con una punta de pipeta de 20 µl en HUVEC confluyentes. Se reemplazó nuevo medio que contenía 5, 10 y 20 µg/ml de antisueros de CLEC14A. Se evaluó la migración quimiocinética de HUVEC adquiriendo imágenes del cierre de herida en los momentos cero, 4, 8, 12 y 24 horas con un microscopio óptico Leica DM 1000 y cámara Xli 2 M USB 2.0. El área abierta de la herida se destacó y se calculó con software analizador de IQ celular.

35 Ensayo de curación de herida por rasguño con anticuerpos monoclonales de CLEC14A

Se realizó un rasguño con una punta de pipeta de 10 µl en HUVEC confluyentes o células de la línea celular endotelial de ratón, SEND. Se aplicó nuevo medio que contenía 1 µg/ml o 10 µg/ml de un anticuerpo monoclonal de CLEC14A inducido en ratones contra el dominio extracelular de CLEC14A. Se evaluó la migración quimiocinética de HUVEC o células SEND adquiriendo imágenes de cierre de la herida en el momento cero, 4, 6, 12 horas con un microscopio

óptico Leica DM 1000 y cámara Xli 2 M USB 2.0. El área abierta de la herida se cuantificó usando software Image J.

Ensayo de flujo

Se disociaron cultivos primarios de HUVEC con tripsina/EDTA (Sigma) y se sembraron en capilares de vidrio rectangulares (microportaobjetos; anchura interna 3 mm, profundidad 0,3 mm) que se habían revestido con colágeno/gelatina. La siembra fue a una densidad que producía monocapas confluyentes en un periodo de 24 horas. Después de sembrar, los microportaobjetos se colocaron en placas de vidrio especialmente construidas, y se unieron a tubos de vidrio que se habían fusionado con la pared. Se conectaron tubos de goma de silicio (Tygon R1000; Fisher, Loughborough, Reino Unido) a cada rama externa. La placa contenía medio de cultivo y se colocó en un incubador de CO₂ humidificado (Nuair DH; Triple Red, Thame, Oxfordshire, Reino Unido). Los tubos se pasaron a través de un orificio en la pared del incubador. Los tubos de dos ramas adyacentes (uno unido a un microportaobjetos y uno vacío) se conectaron y se colocaron en una bomba de 8 rodillos, multicanal (modelo 502S; Watson Marlow Ltd.) formando un bucle de flujo continuo. El orificio de los tubos de bomba y la velocidad de bomba se seleccionaron para suministrar un caudal (7,76 ml/min) que producía una tensión de corte de pared de 2,0 Pa (= 20 dyn/cm²) en el microportaobjetos. La bomba y los tubos externos se incluyeron en una caja perspex, regulada termostáticamente a 37 °C. Los tubos de un microportaobjetos separado en cada placa se conectaron a una bomba separada. Esta bombeó una cantidad pequeña de medio a través del microportaobjetos durante 30 segundos una vez cada hora, para permitir el crecimiento prolongado en condiciones "estáticas". Se cultivaron HUVEC en condiciones estáticas durante 24 horas y después se expusieron a tensión de corte de 2,0 Pa durante 24 horas. Se expusieron microportaobjetos de flujo y estáticos emparejados en cada placa a medio recirculado idéntico durante los mismos periodos.

Inmunofluorescencia en tejidos incluidos en parafina

Se realizó inmunofluorescencia en una colección de tejido humano de cáncer y normal incluido en parafina obtenido del servicio de histología de Cancer Research Reino Unido y en matrices de tejido canceroso y normal (Superbiochips). Se usaron cánceres humanos comunes 1 (MA2) que incluían 10 núcleos de cada uno de los siguientes carcinomas: estómago, esófago, pulmón, colon/recto, tiroides y riñón, y cánceres comunes 2 (MB3) que incluían 10 núcleos de cada uno de los siguientes carcinomas: mama, hígado, vejiga, ovario, páncreas y próstata. También se analizaron dos matrices de control adicionales de tejidos normales adyacentes coincidentes. Después de la retirada de la parafina, los tejidos se rehidrataron y se calentaron en microondas durante 3 minutos con potencia media en tampón de citrato pH 6 para recuperación de antígeno. Las secciones se bloquearon en PBST que contenía FCS 10 % y BSA 3 %. Las secciones se exploraron con 10 µg/ml de anticuerpo policlonal primario IgG de oveja contra el dominio extracelular de CLEC14A humano (R & D system) y 15 µg/ml de anticuerpo policlonal anti oveja secundario de IgG de conejo conjugado con FITC (Zymax). Las células endoteliales vasculares se tiñeron con 20 µg/ml de aglutinina I de *Ulex europeus* (UEAI) conjugada con rodamina (Vector labs). Los portaobjetos se montaron permanentemente con reactivo anti descoloración de oro prolong con DAPI (Invitrogen) para contrateñir núcleos celulares. La tinción de secciones se analizó usando un microscopio confocal de exploración con láser 510 (Carl Zeiss).

Preparación de anticuerpos monoclonales

Los antígenos usados para la preparación de anticuerpos monoclonales fueron CLEC14A-Fc murino (CM) y CLEC14A-Fc humano (CH), opcionalmente conjugados con proteína adyuvante (AP). Estos cuatro antígenos (CM, CH, CM-AP, CH-AP) se usaron para inmunización de ratones usando el siguiente protocolo:

Día	Operación
0	Toma de muestra preinmunitaria. Inmunización de 100 µg de antígeno en adyuvante completo de Freund (almohadillas plantares)
14	Inmunización de 100 µg de antígeno en adyuvante incompleto de Freund (almohadillas plantares)
17	Toma de sangre de ensayo
18	Recogida de ganglio linfático poplíteo para fusión

Los sueros se ensayaron por ELISA contra tres antígenos: CM, CH y Fc. Se tomó un suero no inmunitario como un control negativo.

El protocolo de fusión fue el siguiente:

- (1) Se recogieron ganglios linfáticos poplíteos de los ratones inmunes y se homogeneizaron.
- (2) Se lavaron las células con DMEM caliente.
- (3) Se mezclaron las células con células de mieloma sp2/0.
- (4) La mezcla se centrifugó (1000 g)
- (5) El sedimento se suspendió en PEG 1500 50 % y se incubó durante 1 min.
- (6) La suspensión se diluyó lentamente con DMEM caliente.
- (7) La suspensión se centrifugó (1000 g).
- (8) Las células se sembraron en placas con macrófagos peritoneales.

(9) Las células se cultivaron a 37 °C y CO₂ 5 %

Se obtuvieron más de 500 clones de hibridoma resistentes a HAT de cada ratón. Todos los sobrenadantes de clones se ensayaron dos veces con intervalos de 4 días por ELISA contra tres antígenos absorbidos (CM, CH y Fc). Los ensayos dieron como resultado 5 clones (todos de la subclase IgG1) que reaccionaron tanto con CM como con CH y no reaccionaron con Fc. Todos los positivos se clonaron 2-4 veces por el procedimiento de dilución limitante, se propagaron en matraces de cultivo y se inyectaron en ratones para líquido ascítico. Tres clones derivaron como resultado de la inmunización con CLEC14a humano (CH), un clon (CRT-3) fue el resultado de la inmunización con CLEC14a humano-AP (CH-AP) y un clon (CRT-2) fue el resultado de la inmunización con CLEC14a de ratón-AP (CM-AP).

10 **Resultados**

La Figura 2 es una gráfica que muestra la expresión relativa de CLEC14A en HUVEC y otras células primarias. CLEC14A se expresó específicamente en células endoteliales. Esto confirma el hallazgo previo de que CLEC14A era específico endotelial (Herbert y col, 2008).

15 La Figura 3 ilustra los resultados de la hibridación in situ del ortólogo de CLEC14A en embrión de pez cebra 24 horas después de la fertilización. El ortólogo de CLEC14A de pez cebra, que se conserva entre pez cebra y ser humano, se expresa en la aorta dorsal y en vasos intersomíticos, lo que muestra que CLEC14A se expresa solamente en sitios de vasculogénesis y angiogénesis en el modelo de embrión de pez cebra.

20 La Figura 4 muestra captura de imágenes por fluorescencia in vivo de una fusión de CLEC14A-GFP de longitud completa en células CHO (que no expresan normalmente CLEC14A). La fusión de CLEC14A-GFP se localiza en la membrana en filopodios y microespículas, con el mismo patrón observado en HUVEC.

La Figura 5 muestra captura de imágenes confocal de expresión de CLEC14A y colocalización con VE-cadherina en HUVEC confluyentes. CLEC14A se expresa en las uniones celulares y se colocaliza con VE-cadherina, en contacto célula-célula, en microespículas protruyentes y filopodios.

25 Estos resultados claramente muestran que CLEC14A es una proteína expresada en superficie celular, haciéndola una molécula ideal para dirección.

30 Se realizó la expresión y localización endógena de CLEC14A en HUVEC por transferencia de Western e inmunofluorescencia. La Figura 6 es una transferencia de Western de reducción por ARNip de la expresión de CLEC14A en HUVEC. CLEC14A se expresó a muy alto nivel en HUVEC, mostrando dos bandas, una a aproximadamente 60 kDa (supuestamente la forma no glucosilada de CLEC14A) y una a aproximadamente 100 kDa (supuestamente la forma glucosilada). La transfección de dobles cadenas de ARNip 10 nM específicas para CLEC14A en HUVEC redujo la intensidad de ambas bandas en aproximadamente 80 %, lo que demuestra que ambas bandas son específicas para CLEC14A. La Figura 7 muestra captura de imágenes confocal de reducción por ARNip de la expresión de CLEC14A en HUVEC. Estos resultados demuestran que las moléculas de ARNip inhibitoras de CLEC14A reducen, de hecho, la expresión de CLEC14A.

35 Se examinó la capacidad de los inhibidores de CLEC14A para inhibir la angiogénesis. La Figura 8A es una imagen de microscopía óptica que muestra que la reducción de la expresión por ARNip de CLEC14A inhibe la migración de células endoteliales en un ensayo de curación de heridas por rasguño de HUVEC. La Figura 9A es una imagen de microscopía óptica que muestra que los anticuerpos policlonales anti CLEC14A inhiben la migración de células endoteliales en un ensayo de curación de heridas por rasguño de HUVEC. Las Figuras 8B y 9B son una representación gráfica de los resultados de 8A y 9A, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en ensayos de curación de heridas por rasguño usando anticuerpos monoclonales. Como se muestra en las Figuras 16A y B, cuando las HUVEC se trataron con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal CRT-3, el 25 % del área de herida permaneció abierto a las 12 h en comparación con 13 % en el control. Como se muestra en las Figuras 17A y B, cuando las células SEND se trataron con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal CRT-2, el 17 % del área de herida permaneció abierto a las 45 12 h en comparación con el 9 % en el control. Estos resultados muestran que los inhibidores de CLEC14A, tales como ARNip y anticuerpos, tienen un efecto inhibitor en la migración de células endoteliales. La migración de células endoteliales es una característica esencial de la angiogénesis. En consecuencia, estos ensayos proporcionan pruebas de que dos inhibidores moleculares distintos de CLEC14A, ARNip y anticuerpos, inhiben la angiogénesis.

50 La Figura 10 ilustra los resultados de PCR en tiempo real de HUVEC en condiciones de tensión de corte y estáticas. ROBO4 es un marcador endotelial tumoral conocido, que es altamente específico para células endoteliales, y cuya inhibición inhibe la angiogénesis. Los ARNm tanto de ROBO4 como de CLEC14A están significativamente regulados negativamente con tensión de corte (2Pa), y la regulación negativa con tensión de corte es un fenómeno que se asocia con los genes proangiogénesis.

55 La expresión de CLEC14A en secciones de tumores sólidos y tejido normal se examinó usando sondas específicas de CLEC14A. Las Figuras 11-14 son imágenes de inmunofluorescencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de tumor ovárico, de vejiga, de hígado, de mama, de colon, rectal, de esófago, de riñón, de pulmón, de próstata, de estómago, pancreático y de tiroides humanos. La especificidad endotelial de la expresión de CLEC14A se confirmó por

colocalización con aglutinina I de *Ulex europaeus* (UEA) que se une con restos de fucosa específicos en células endoteliales. Se vio expresión de CLEC14A en los vasos sanguíneos en todos los tejidos tumorales analizados. Los tumores ovárico, de vejiga, de hígado, de mama, de riñón y de próstata eran fuertemente positivos para expresión de CLEC14A, mientras que los tejidos tumorales de estómago, esófago, pulmón, colon, rectal, pancreático y de tiroides mostraron un menor nivel de expresión de CLEC14A específica. La expresión de CLEC14A no se detectó en ninguno de los tejidos de control normales correspondientes (no tumorales). Se muestran ejemplos representativos de imágenes de inmunofluorescencia que muestran una ausencia de la expresión de CLEC14A en tejidos de cerebro, corazón y riñón humanos normales en la Figura 15. En consecuencia, se ha demostrado que CLEC14A se expresa específicamente en vasculatura tumoral.

10 **Conclusión**

Tomados juntos, los resultados de este estudio demuestran que la proteína transmembrana CLEC14A es un marcador endotelial tumoral previamente no reconocido.

Ejemplo 2: tratamiento de un tumor sólido en un modelo animal

15 Un modelo de ratón de un tumor sólido (por ejemplo un implante de homoinjerto subcutáneo de carcinoma de pulmón de Lewis en ratones Black 57 o un implante de xenoinjerto subcutáneo HT29 en ratones desnudos) se trata con infusiones intravenosas de soluciones salinas de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos que se unen selectivamente con el polipéptido CLEC14A. Las infusiones se administran semanalmente durante un tiempo de 2 a 4 meses. El tumor retrocede en el modelo animal en comparación con los controles.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Cancer Research Technology Limited

<120> Inhibidores

25 <130> CRTBV/P46635PC

<150> US 61/239584

<151> 03-09-2009

30 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 490

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Arg Pro Ala Phe Ala Leu Cys Leu Leu Trp Gln Ala Leu Trp Pro

1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Gly Glu His Pro Thr Ala Asp Arg Ala Gly Cys Ser

20 25 30

Ala Ser Gly Ala Cys Tyr Ser Leu His His Ala Thr Met Lys Arg Gln

35 40 45

Ala Ala Glu Glu Ala Cys Ile Leu Arg Gly Gly Ala Leu Ser Thr Val

50 55 60

Arg Ala Gly Ala Glu Leu Arg Ala Val Leu Ala Leu Leu Arg Ala Gly

65 70 75 80

Pro Gly Pro Gly Gly Gly Ser Lys Asp Leu Leu Phe Trp Val Ala Leu

85 90 95

40 Glu Arg Arg Arg Ser His Cys Thr Leu Glu Asn Glu Pro Leu Arg Gly

ES 2 567 030 T3

	100		105		110
Phe Ser Trp Leu Ser Ser Asp Pro Gly Gly Leu Glu Ser Asp Thr Leu					
	115		120		125
Gln Trp Val Glu Glu Pro Gln Arg Ser Cys Thr Ala Arg Arg Cys Ala					
	130		135		140
Val Leu Gln Ala Thr Gly Gly Val Glu Pro Ala Gly Trp Lys Glu Met					
145		150		155	160
Arg Cys His Leu Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Cys Lys Tyr Gln Phe Glu					
	165		170		175
Val Leu Cys Pro Ala Pro Arg Pro Gly Ala Ala Ser Asn Leu Ser Tyr					
	180		185		190
Arg Ala Pro Phe Gln Leu His Ser Ala Ala Leu Asp Phe Ser Pro Pro					
	195		200		205
Gly Thr Glu Val Ser Ala Leu Cys Arg Gly Gln Leu Pro Ile Ser Val					
	210		215		220
Thr Cys Ile Ala Asp Glu Ile Gly Ala Arg Trp Asp Lys Leu Ser Gly					
225		230		235	240
Asp Val Leu Cys Pro Cys Pro Gly Arg Tyr Leu Arg Ala Gly Lys Cys					
	245		250		255
Ala Glu Leu Pro Asn Cys Leu Asp Asp Leu Gly Gly Phe Ala Cys Glu					
	260		265		270
Cys Ala Thr Gly Phe Glu Leu Gly Lys Asp Gly Arg Ser Cys Val Thr					
	275		280		285
Ser Gly Glu Gly Gln Pro Thr Leu Gly Gly Thr Gly Val Pro Thr Arg					
	290		295		300
Arg Pro Pro Ala Thr Ala Thr Ser Pro Val Pro Gln Arg Thr Trp Pro					
305		310		315	320

Ile Arg Val Asp Glu Lys Leu Gly Glu Thr Pro Leu Val Pro Glu Gln
 325 330 335

Asp Asn Ser Val Thr Ser Ile Pro Glu Ile Pro Arg Trp Gly Ser Gln
 340 345 350

Ser Thr Met Ser Thr Leu Gln Met Ser Leu Gln Ala Glu Ser Lys Ala
 355 360 365

Thr Ile Thr Pro Ser Gly Ser Val Ile Ser Lys Phe Asn Ser Thr Thr
 370 375 380

Ser Ser Ala Thr Pro Gln Ala Phe Asp Ser Ser Ser Ala Val Val Phe
 385 390 395 400

Ile Phe Val Ser Thr Ala Val Val Val Leu Val Ile Leu Thr Met Thr
 405 410 415

Val Leu Gly Leu Val Lys Leu Cys Phe His Glu Ser Pro Ser Ser Gln
 420 425 430

Pro Arg Lys Glu Ser Met Gly Pro Pro Gly Leu Glu Ser Asp Pro Glu
 435 440 445

Pro Ala Ala Leu Gly Ser Ser Ser Ala His Cys Thr Asn Asn Gly Val
 450 455 460

Lys Val Gly Asp Cys Asp Leu Arg Asp Arg Ala Glu Gly Ala Leu Leu
 465 470 475 480

Ala Glu Ser Pro Leu Gly Ser Ser Asp Ala
 485 490

<210> 2
 <211> 2256
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ctcctcttgc tctaagcagg gtgtttgacc ttctagtcga ctgcgtcccc tgtaccocggc 60

5

10

ES 2 567 030 T3

gccagctgtg ttcoctgacc cagaataact cagggctgca ccgggcctgg cagcgtccg 120
 cacacatttc ctgtcgcggc ctaagggaaa ctggtggccg ctgggcccg cgggggattc 180
 ttggcagttg gggggctcgt cgggagcgag ggcggagggg aagggagggg gaaccgggtt 240
 ggggaagcca gctgtagagg gcggtgaccg cgctccagac acagctctgc gtccctcgagc 300
 gggacagatc caagttggga gcagctctgc gtgcggggcc tcagagaatg aggccggcgt 360
 tcgccctgtg cctcctctgg caggcgtctt gggccggggc gggcggcggc gaacacccca 420
 ctgccgaccg tgctggctgc tcggcctcgg gggcctgcta cagcctgcac caagctacca 480
 tgaagcggca ggcggccgag gaggcctgca tctgcgagg tggggcgctc agcaccgtgc 540
 gtgcgggcgc cgagctgcgc gctgtgctcg cgctcctgcg ggcaggccca gggcccggag 600
 ggggctccaa agacctgctg ttctgggtcg cactggagcg caggcgttcc cactgcaccc 660
 tggagaacga gcctttgcgg ggtttctcct ggctgtcctc cgaccccggc ggtctcgaaa 720
 gcgacacgct gcagtggtg gaggagcccc aacgctcctg caccgcgcgg agatgcgcgg 780
 tactccaggc caccggtggg gtcgagcccc caggctggaa ggagatgca tgccacctgc 840
 gcgccaacgg ctacctgtgc aagtaccagt ttgaggtctt gtgtcctgcg ccgcgccccg 900
 gggcgcctc taacttgagc tctcgcgcgc ccttcagct gcacagcgc gctctggact 960
 tcagtccacc tgggaccgag gtgagtgcgc tctgccgggg acagctcccg atctcagtta 1020
 cttgcatcgc ggacgaaatc ggcgctcgtt gggacaaact ctcgggcgat gtgttgtgtc 1080
 cctgccccgg gaggtacctc cgtgctggca aatgcgcaga gctccctaac tgccctagacg 1140
 acttgggagg ctttgccctgc gaatgtgcta cgggcttcga gctggggaag gacggccgct 1200
 cttgtgtgac cagtggggaa ggacagccga cccttggggg gaccygggtg cccaccaggc 1260

ES 2 567 030 T3

gcecgccggc cactgcaacc agccccgtgc cgcagagaac atggccaatc agggctcgacg 1320
 agaagctggg agagacacca cttgtccctg aacaagacaa ttcagtaaca tctattcctg 1380
 agattcctcg atggggatca cagagcacga tgtctaccct tcaaagtcc cttcaagccg 1440
 agtcaaaggc cactatcacc ccatcagggg gcgatgattc caagttaat tctacgactt 1500
 cctctgccac tctcaggtt ttcgactcct cctctgccgt ggtcttcata tttgtgagca 1560
 cagcagtagt agtggtggtg atcttgacca tgacagtact ggggcttgtc aagctctgct 1620
 ttcacgaaag cccctcttc cagccaagga aggagtctat gggccccgcg ggctggaga 1680
 gtgatcctga gcccgctgct ttgggctcca gttctgcaca ttgcacaaac aatgggggtga 1740
 aagtcgggga ctgtgatctg cgggacagag cagaggggtgc cttgctggcg gagtcccctc 1800
 ttggctctag tgatgcatag ggaaacaggg gacatgggca ctctgtgaa cagtttttca 1860
 cttttgatga aacggggaac caagaggaac ttacttgtgt aactgacaat ttctgcagaa 1920
 atcccccttc ctctaaattc cctttactcc actgaggagc taaatcagaa ctgcacactc 1980
 cttccctgat gatagaggaa gtggaagtgc ctttaggatg gtgatactgg gggaccgggt 2040
 agtgctgggg agagatattt tcttatgttt attcggagaa tttggagaag tgattgaact 2100
 tttcaagaca ttggaacaa atagaacaca atataattta cattaaaaaa taatttctac 2160
 caaaatggaa aggaaatggt ctatgttgtt caggctagga gtatattggt tcgaaatccc 2220
 agggaaaaaa ataaaaataa aaaattaaag gattgt 2256

<210> 3
 <211> 1473
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

ES 2 567 030 T3

atgaggecgg egttcgccct gtgcctctc tggcaggcgc tctggcccgg gccgggcggc 60
 ggcgaaacacc ccaactgccga ccgtgctggc tgctcggcct cgggggacctg ctacagcctg 120
 caccacgcta ccatgaagcg gcaggcggcc gaggaggcct gcatcctgcg aggtggggcg 180
 ctcagcaccg tgcgtgcggg cgcagagctg cgcgctgtgc tcgcgctcct ggggacaggc 240
 ccagggcccc gagggggctc caaagacctg ctgttctggg tcgcactgga gcgcaggcgt 300
 tcccactgca ccctggagaa cgagcctttg cggggtttct cctggctgtc ctccgacccc 360
 ggcggctctg aaagcgacac gctgcagtgg gtggaggagc cccaacgctc ctgcaccgcg 420
 cggagatgcg cggtaactca gccaccgggt ggggtcgagc ccgcaggctg gaaggagatg 480
 cgatgccacc tgcgcgcaa cggtacctg tgcaagtacc agtttgaggt cttgtgtcct 540
 ggcgcgcgcc ccggggccgc ctctaacttg agctatcgcg cgccttcca gctgcacagc 600
 gccgctctgg acttcagtc accctggacc gaggtgagtg cgcctcgcg gggacagctc 660
 ccgatctcag ttacttgcac cgcggacgaa atcggcgctc gctgggacaa actctcgggc 720
 gatgtgttgt gtccctgccc cgggaggtac ctccgtgctg gcaaatgcg agagctccct 780
 aactgcctag acgacttggg aggccttgcc tgcgaatgtg ctacgggctt cgagctgggg 840
 aaggacggcc gctcttgtgt gaccagtggg gaaggacagc cgacccttgg ggggaccggg 900
 gtgccacca ggcgcccgcc ggccactgca accagccccg tgccgcagag aacatggcca 960
 atcagggctg acgagaagct gggagagaca ccactgtcc ctgaacaaga caattcagta 1020
 acatctattc ctgagattcc tcgatgggga tcacagagca cgatgtctac ccttcaaatg 1080
 tcccttcaag ccgagtcaaa ggccactatc accccatcag ggagcgtgat ttccaagttt 1140
 aattctacga cttcctctgc cactcctcag gctttcgact cctcctctgc cgtggctctc 1200
 atatttgtga gcacagcagt agtagtgtg gtgatcttga ccatgacagt actggggctt 1260

ES 2 567 030 T3

gtcaagctct gctttcacga aagcccctct tcccagccaa ggaaggagtc tatgggcccc 1320
 ccgggcctgg agagtgatcc tgagcccgct gctttgggct ccagttctgc acattgcaca 1380
 aacaatgggg tgaaagtcgg ggactgtgat ctgcggggaca gagcagaggg tgccttgctg 1440
 gcggagtccc ctcttgctc tagtgatgca tag 1473

5 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> doble cadena de ARNip de CLEC14A 1

<400> 4
 gaacaagaca attcagtaa 19

15 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> doble cadena de ARNip de CLEC14A 2

<400> 5
 caatcagggt cgacgagaa 19

25 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador de CLEC14A

<400> 6
 ctgggaccga ggtgagtg 18

35 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador de CLEC14A

<400> 7
 cgcgatgcaa gtaactgaga 20

45 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador de flotilina 2

55 <400> 8
 tgtgtggtt ccgactataa acag 24

ES 2 567 030 T3

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador de flotilina 2
 <400> 9
 10 gggctgcaac gtcataatct 20
 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de zClec14A
 20 <400> 10
 ggagaaaag cagacaatat catttta 27
 <210> 11
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso de zClec14A
 30 <400> 11
 agtctctctc acttaggttt cctcttt 27
 <210> 12
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador directo de zClec14A
 <400> 12
 aaacctaagt gagagagact gtgc 24
 45 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador inverso de zClec14A
 <400> 13
 55 acagagtacg ctatttcat ccatc 25
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador directo de factor de elongación 1 alfa
 <400> 14
 65 caccctggga gtgaaaca 18
 <210> 15

ES 2 567 030 T3

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador inverso de factor de elongación 1 alfa

10 <400> 15
acttcagggc gatgtgagc 19

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de CLEC14A para su uso en la inhibición de la angiogénesis tumoral en un individuo, en el que el inhibidor es un anticuerpo que se une específicamente con el polipéptido CLEC14A, o en el que el inhibidor es una molécula de ARNip, una molécula antisentido o una ribozima específica para el polinucleótido de CLEC14A, o un polinucleótido o vector que codifica dicha molécula de ARNip, molécula antisentido o ribozima.
2. Un inhibidor de CLEC14A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo se une específicamente con el dominio extracelular del polipéptido CLEC14A maduro.
3. Un inhibidor de CLEC14A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monocatenario.
4. Un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto citotóxico, para su uso en la inhibición de la angiogénesis tumoral en un individuo.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el resto citotóxico se selecciona de un agente quimioterapéutico directamente citotóxico, un polipéptido directamente citotóxico, un resto que es capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico, un radiosensibilizador, un ácido nucleico directamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido directamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad enzimática y es capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico o un átomo radiactivo, en el que, opcionalmente, el átomo radiactivo es fósforo 32, yodo 125, yodo 131, indio 111, renio 186, renio 188 o itrio 90.
6. Un inhibidor o un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el inhibidor o el compuesto se formula como un medicamento que también comprende al menos un agente antineoplásico adicional.
7. Un inhibidor o un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el individuo es uno al que se administra al menos un agente antineoplásico adicional.
8. Un inhibidor o un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 en el que el al menos un agente antineoplásico adicional se selecciona de cisplatino; carboplatino; 5-fluorouracilo; paclitaxel; mitomicina C; doxorubicina; gemcitabina; tomudex; pemetrexed; metotrexato; irinotecán, fluorouracilo y leucovorina; oxaliplatino, 5-fluorouracilo y leucovorina; y paclitaxel y carboplatino.
9. Un compuesto que comprende (i) un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido CLEC14A y (ii) un resto detectable, para su uso en la captura de imágenes de neovasculatura tumoral en el cuerpo de un individuo.
10. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende además detectar la localización del compuesto en el individuo.
11. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en el que el resto detectable comprende yodo 123, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, tecnecio-99m, gadolinio, manganeso o hierro.
12. Un inhibidor o un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el individuo es un ser humano.
13. Un inhibidor o un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el individuo tiene un tumor sólido, por ejemplo un tumor sólido del colon, recto, ovario, hígado, vejiga, próstata, mama, riñón, páncreas, estómago, esófago, pulmón o tiroides.
14. Un inhibidor o un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que el tumor sólido no es un tumor de pulmón y/o no es un tumor rectal.

FIGURA 1

A: SECUENCIA POLIPEPTÍDICA DE CLEC14A (SEQ ID NO: 1)

1 MRPALFALCLL WQALWPGPGG GEHPTADRAG CSASGACYSL HHATMKRQAA EEACILRGG A
 61 LSTVRAG AEL RAVLALLRAG PGPGGGSKDL LEFWALERRR SHCTLENEPL RGF SWLSSDP
 121 GGLESDTLQW VEEPQR SCTA RRC AVLQATG GVEPAGWKEM RCHLRANGYL CKYQFEVLC P
 181 APRFGAASN L SYRAPFQLHS AALDFSPPGT EVSALCRGQL PISVT CIADE IGARWDKLS G
 241 DVLCPCPGRY LRAGKCAELP NCLDDLGGFA CECATGFELG KDGRSCVTS G EGQPTLGGT G
 301 VPTRRPPATA TSPVPQRTWP IRVDEKLGET PLVPEQDNSV TSIPEIPRWG SQSTMSTLQ M
 361 SLOAESKATI TPSGSVISKF NSTTSSATPQ AFDSSSAVVF IFVSTAVVVL VILTM TVLGL
 421 VKLCFHESPS SQPRKESMGP PGLSDPEPA ALGSSSAHCT NNGVKVGD CD LRDRAEGALL
 481 AESPLGSSDA

B: SECUENCIA DE ADNc DE CLEC14A (SEQ ID NO: 2)

1 CTCTCTTGC TCTAAGCAGG GTGTTGACC TTCTAGTCGA CTGCGTCCCC TGTACCCGGC
 61 GCCAGCTGTG TTCCTGACCC CAGAATAACT CAGGGCTGCA CCGGGCCTGG CAGCGCTCCG
 121 CACACATTC CTGTCGCGGC CTAAGGGAAA CTGTTGGCCG CTGGGCCCGC GGGGGGATTC
 181 TTGCCAGTTG GGGGGTCCGT CGGGAGCGAG GGCGGAGGGG AAGGGAGGGG GAACCGGGTT
 241 GGGGAAGCCA GCTGTAGAGG GCGGTGACCG CGCTCCAGAC ACAGCTCTGC GTCCTCGAGC
 301 GGGACAGATC CAAGTTGGGA GCAGCTCTGC GTGCGGGGCC TCAGAGAATG AGGCCGGCGT
 361 TCGCCCTGTG CCTCCTCTGG CAGGCGCTCT GGCCCGGGCC GGGCGGCGGC GAACACCCCA
 421 CTGCCGACCG TGCTGGCTGC TCGGCCCTCG GGGCCTGCTA CAGCCTGCAC CAGCTACCA
 481 TGAAGCGGCA GGC GGCCGAG GAGGCCTGCA TCCTGCGAGG TGGGGCGETC AGCACC GTGC
 541 GTGCGGGCGC CGAGCTGCGC GCTGTGCTCG CGCTCCTGCG GGCAGGCCCA GGGCCCGGAG
 601 GGGGCTCCAA AGACCTGCTG TTCTGGGTG CACTGGAGCG CAGGCGTTCC CACTGCACCC
 661 TGGAGAACGA GCCTTTGCGG GGTTTCTCCT GGCTGTCTC CGACCCCGGC GGTCTCGAAA
 721 GCGACACGCT GCAGTGGGTG GAGGAGCCCC AACGCTCCTG CACCGCGCGG AGATGCGCGG
 781 TACTCCAGGC CACCGGTGGG GTCGAGCCCG CAGGCTGGAA GGAGATGCGA TGCCACCTGC
 841 GCGCCAACGG CTACCTGTGC AAGTACCAGT TTGAGGTCTT GTGTCCTGCG CCGCGCCCCG
 901 GGGCCGCCTC TAACTTGAGC TATCGCGCGC CCTTCCAGCT GCACAGCGCC GCTCTGGACT
 961 TCAGTCCACC TGGGACCGAG GTGAGTGCGC TCTGCCGGGG ACAGCTCCCG ATCTCAGTTA
 1021 CTTGCATCGC GGACGAAATC GGC GCTCGCT GGGACAAACT CTCGGGGCGAT GTGTTGTGTC
 1081 CCTGCCCCGG GAGGTACCTC CGTGCTGGCA AATGCGCAGA GCTCCCTAAC TGCCTAGACG
 1141 ACTTGGGAGG CTTTGCCCTGC GAATGTGCTA CGGGCTTCGA GCTGGGGAAG GACGGCCGCT
 1201 CTTGTGTGAC CAGTGGGGAA GGACAGCCGA CCCTTGGGGG GACCGGGGTG CCCACCAGGC
 1261 GCCCGCCGGC CACTGCAACC AGCCCCGTGC CGCAGAGAAC ATGGCCAATC AGGGTCGACG
 1321 AGAAGCTGGG AGAGACACCA CTTGTCCCTG AACAAAGACAA TTCAGTAACA TCTATTCTCT

1381 AGATTCTCG ATGGGGATCA CAGAGCACGA TGTCTACCCT TCAATGTCC CTTCAAGCCG
 1441 AGTCAAAGGC CACTATCACC CCATCAGGGA GCGTGATTTC CAAGTTAAT TCTACGACTT
 1501 CCTCTGCCAC TCCTCAGGCT TTCGACTCCT CCTCTGCCGT GGTCTTCATA TTTGTGAGCA
 1561 CAGCAGTAGT AGTGTGGTG ATCTTGACCA TGACAGTACT GGGGCTTGTC AAGCTCTGCT
 1621 TTCACGAAAG CCCCTCTTCC CAGCCAAGGA AGGAGTCTAT GGGCCCGCCG GGCTGGAGA
 1681 GTGATCCTGA GCCCGCTGCT TTGGGCTCCA GTTCTGCACA TTGCACAAAC AATGGGGTGA
 1741 AAGTCGGGGA CTGTGATCTG CGGGACAGAG CAGAGGGTGC CTTGCTGGCG GAGTCCCTC
 1801 TTGGCTCTAG TGATGCATAG GGAAACAGGG GACATGGGCA CTCCTGTGAA CAGTTTTTCA
 1861 CTTTTGATGA AACGGGGAAC CAAGAGGAAC TTAATTGTGT AACTGACAAT TTCTGCAGAA
 1921 ATCCCCCTTC CTCTAAATTC CCTTTACTCC ACTGAGGAGC TAAATCAGAA CTGCACACTC
 1981 CTTCCTGAT GATAGAGGAA GTGGAAGTGC CTTTAGGATG GTGATACTGG GGGACCGGGT
 2041 AGTGCTGGGG AGAGATATTT TCTTATGTTT ATTCGGAGAA TTTGGAGAAG TGATTGAACT
 2101 TTTCAAGACA TTGAAACAA ATAGAACACA ATATAATTA CATTAAAAA TAATTTCTAC
 2161 CAAAATGGAA AGGAAATGTT CTATGTTGTT CAGGCTAGGA GTATATTGGT TCGAAATCCC
 2221 AGGGAAAAA ATAAAAATAA AAAATTAAAG GATTGT

C: SECUENCIA CODIFICANTE DE CLEC14A (SEQ ID NO: 3)

ATGAGGCCGG EGTCGCCCT GTGCCTCCTC TGGCAGGCGC TCTGGCCCGG GCCGGGCGGC 60
 GGCGAACACC CCACTGCCGA CCGTGCTGGC TGCTCGGCCT CGGGGGCCTG CTACAGCCTG 120
 CACCACGCTA CCATGAAGCG GCAGGCGGCC GAGGAGGCCT GCATCCTGCG AGGTGGGGCG 180
 CTCAGCACCG TGGGTGCGGG CGCCGAGCTG CGCGCTGTGC TCGCGTCTCT GCGGGCAGGC 240
 CCAGGGCCCG GAGGGGGCTC CAAAGACCTG CTGTTCTGGG TCGCACTGGA GCGCAGGCGT 300
 TCCCACTGCA CCTTGAGAA CGAGCCTTTG CGGGGTTTCT CCTGGCTGTC CTCCGACCCC 360
 GGCGGTCTCG AAAGCGACAC GCTGCAGTGG GTGGAGGAGC CCAACGCTC CTGCACCGCG 420
 CGGAGATGCG CGGTACTCCA GGCCACCGGT GGGGTGAGC CGCAGGCTG GAAGGAGATG 480
 CGATGCCACC TGGCGCCAA CGGCTACCTG TGCAAGTACC AGTTTGAGGT CTTGTGTCTT 540
 GCGCCGCGCC CCGGGGCGC CTCTAACTTG AGCTATCGCG CGCCCTTCCA GCTGCACAGC 600
 GCGGCTCTGG ACTTCAGTCC ACCTGGGACC GAGGTGAGTG CGCTCTGCCG GGGACAGCTC 660
 CCGATCTCAG TTAATTGCAT CGCGGACGAA ATCGGCGCTC GCTGGGACAA ACTCTCGGGC 720
 GATGTGTTGT GTCCCTGCCC CGGGAGGTAC CTCCGTGCTG GCAAATGCGC AGAGCTCCCT 780
 AACTGCCTAG ACGACTTGGG AGGCTTTGCC TGCGAATGTG CTACGGGCTT CGAGCTGGGG 840
 AAGGACGGCC GCTCTTGTGT GACCAGTGGG GAAGGACAGC CGACCCTTGG GGGGACCGGG 900
 GTGCCACCA GGCGCCCGC GGCCACTGCA ACCAGCCCCG TGCCGCAGAG AACATGGCCA 960
 ATCAGGGTCG ACGAGAAGCT GGGAGAGACA CCACTTGTCC CTGAACAAGA CAATTCAGTA 1020
 ACATCTATTC CTGAGATTCC TCGATGGGGA TCACAGAGCA CGATGTCTAC CCTTCAAATG 1080
 TCCCTTCAAG CCGAGTCAA A GGCCACTATC ACCCCATCAG GGAGCGTGAT TTCCAAGTTT 1140
 AATTCTACGA CTTCTCTGC CACTCCTCAG GCTTTCGACT CCTCCTCTGC CGTGGTCTTC 1200
 ATATTTGTGA GCACAGCAGT AGTAGTGTG GTGATCTTGA CCATGACAGT ACTGGGGCTT 1260

GTC AAGCTCT GCTTTCACGA AAGCCCCCTCT TCCCAGCCAA GGAAGGAGTC TATGGGCECG 1320
CCGGGCCTGG AGAGTGATCC TGAGCCCGCT GCTTTGGGCT CCAGTTCTGC ACATTGCACA 1380
AACAAATGGGG TGAAAGTCGG GGA CTGTGAT CTGCGGGACA GAGCAGAGGG TGCCTGCTG 1440
GCGGAGTCCC CTCTTGGCTC TAGTGATGCA TAG

FIGURA 2

CLEC14A

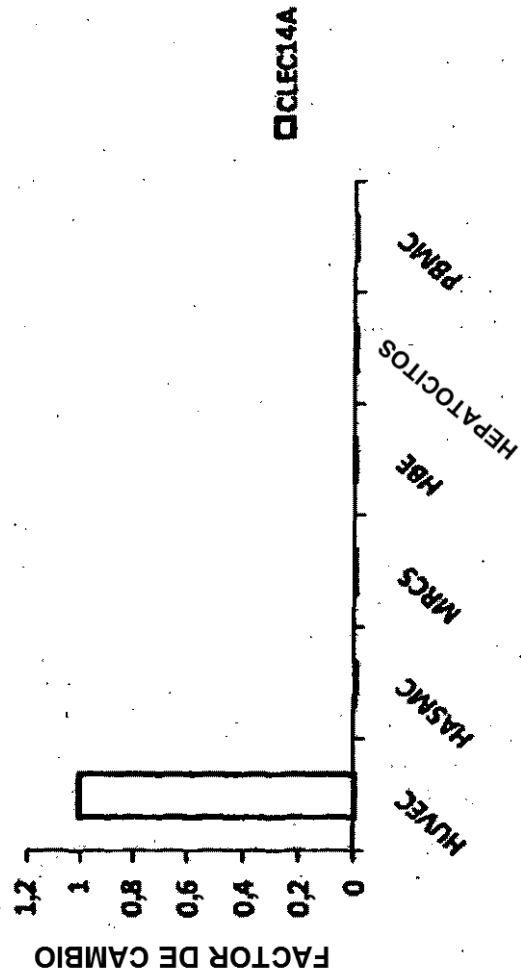


FIGURA 3

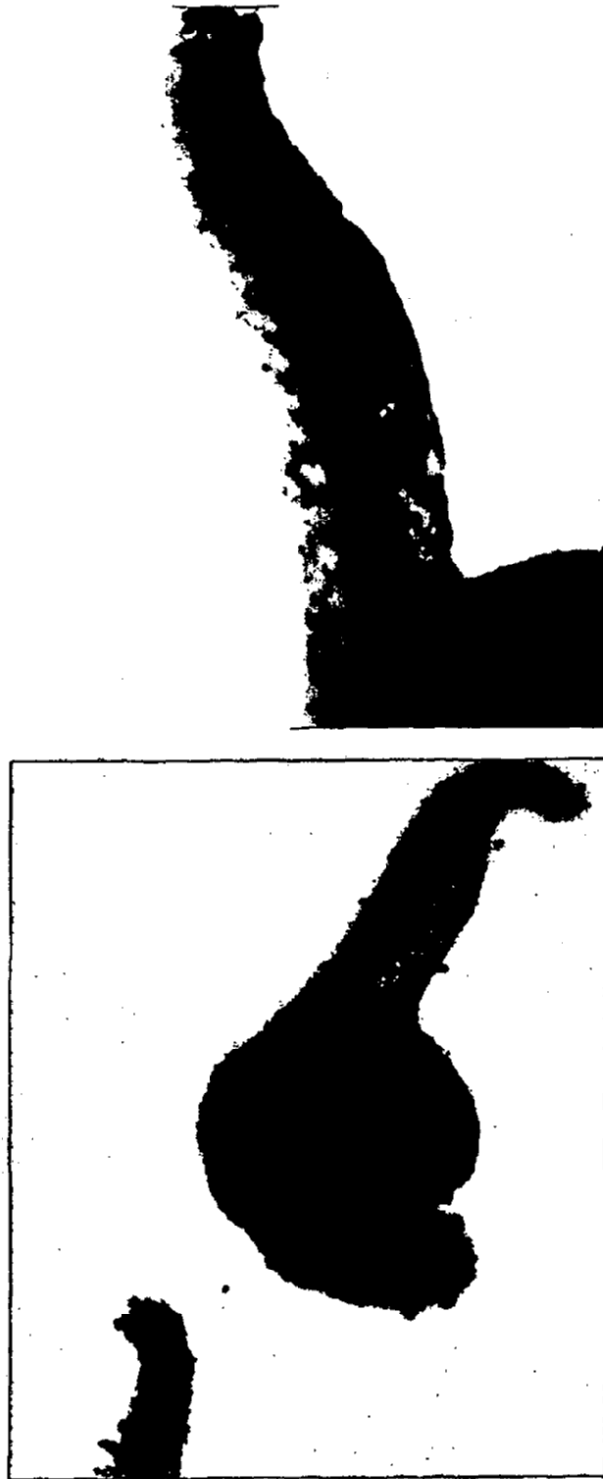


FIGURA 4



FIGURA 5

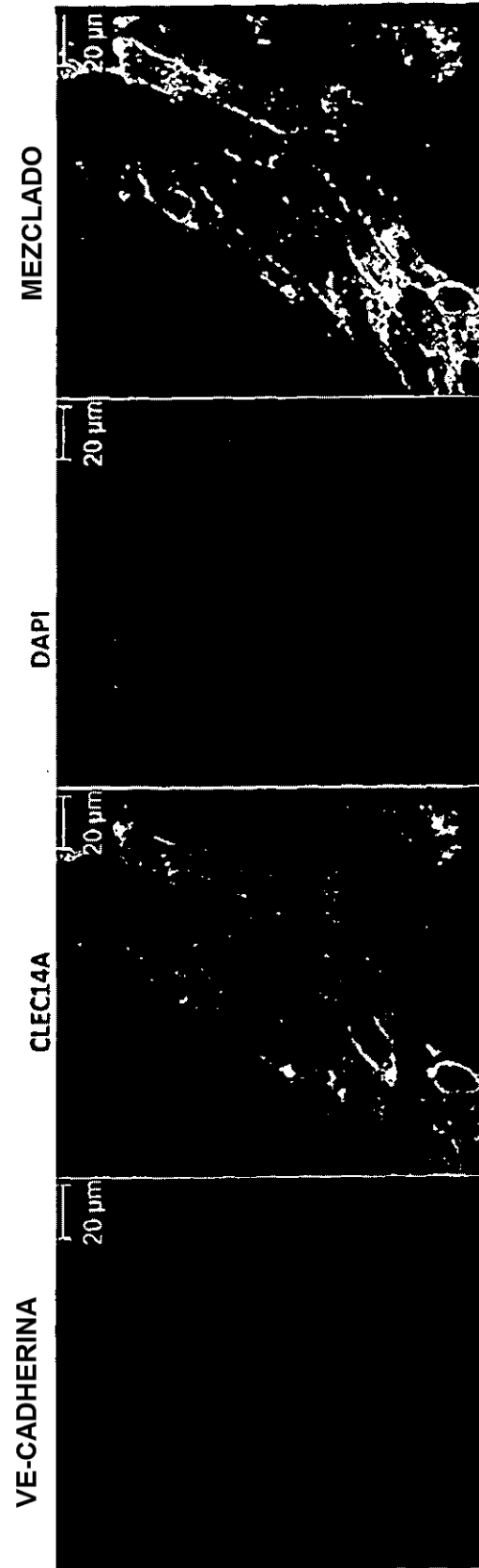


FIGURA 6

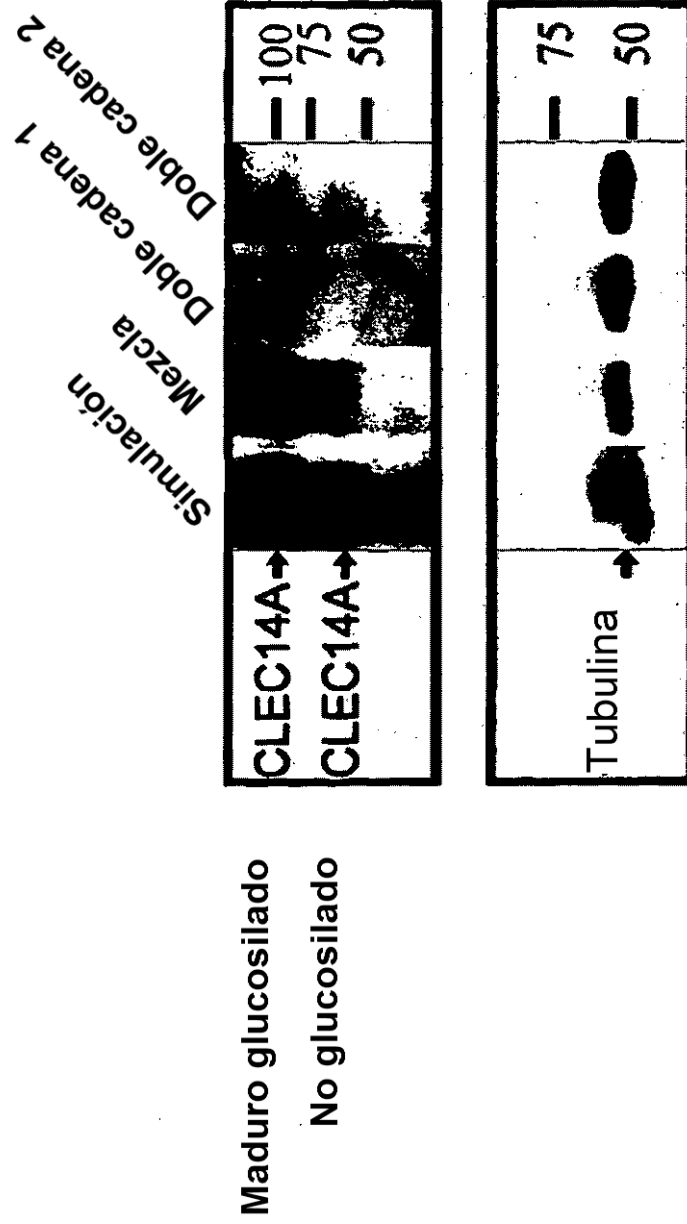


FIGURA 7

Captura de imágenes confocal de reducción por ARNip de la expresión de CLEC14A en HUVEC

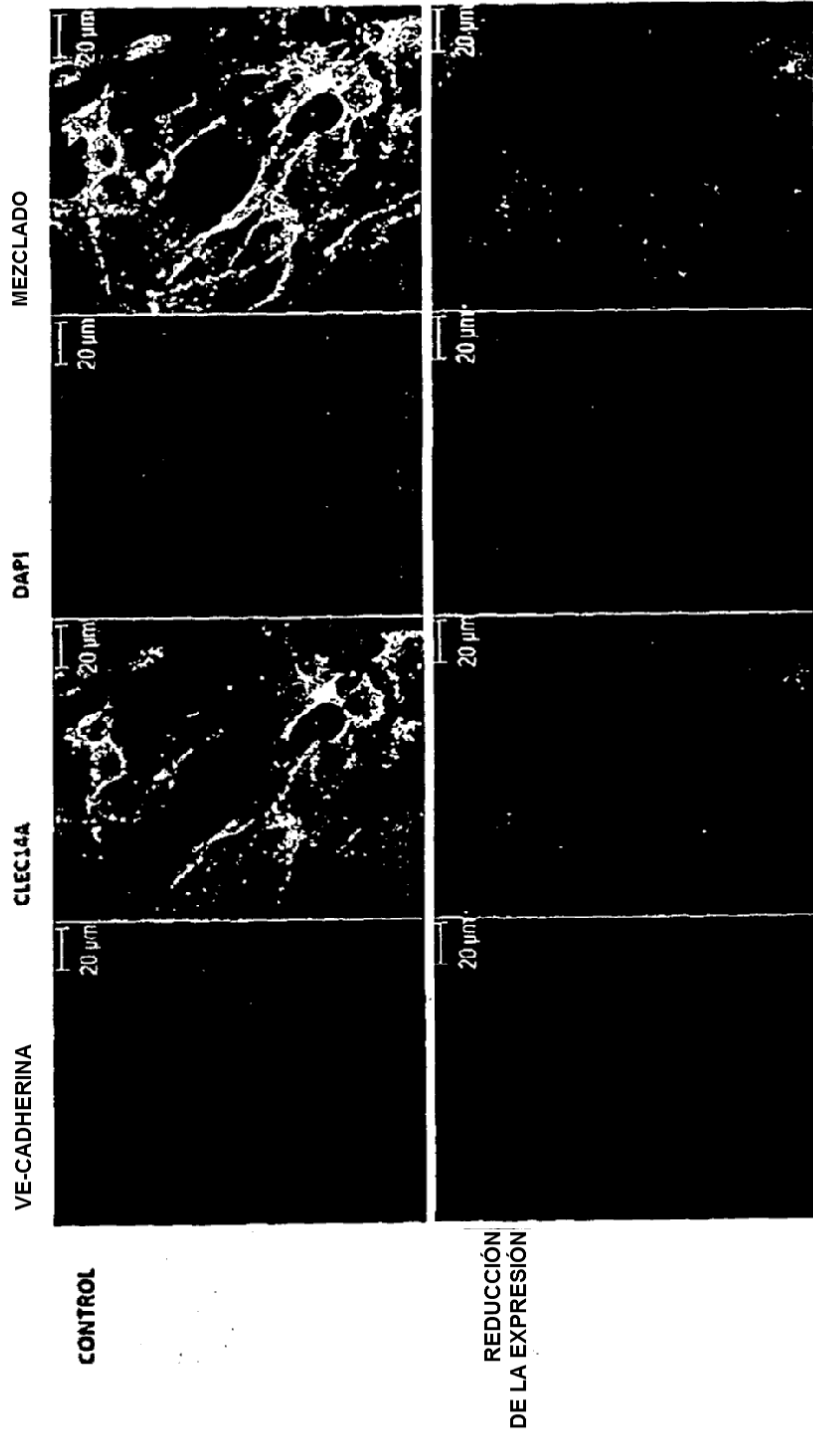


FIGURA 8 (A)

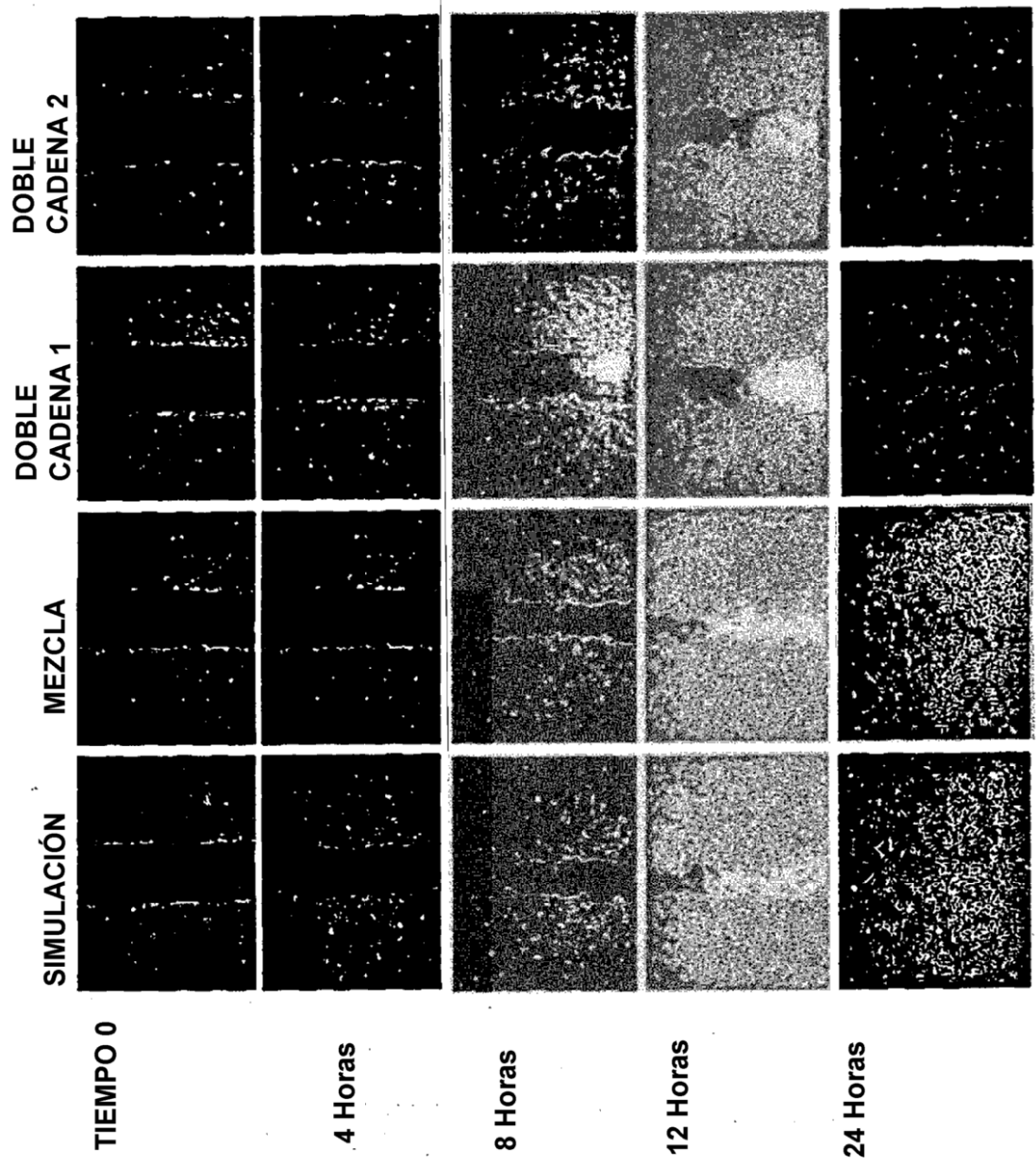


FIGURA 8 (B)

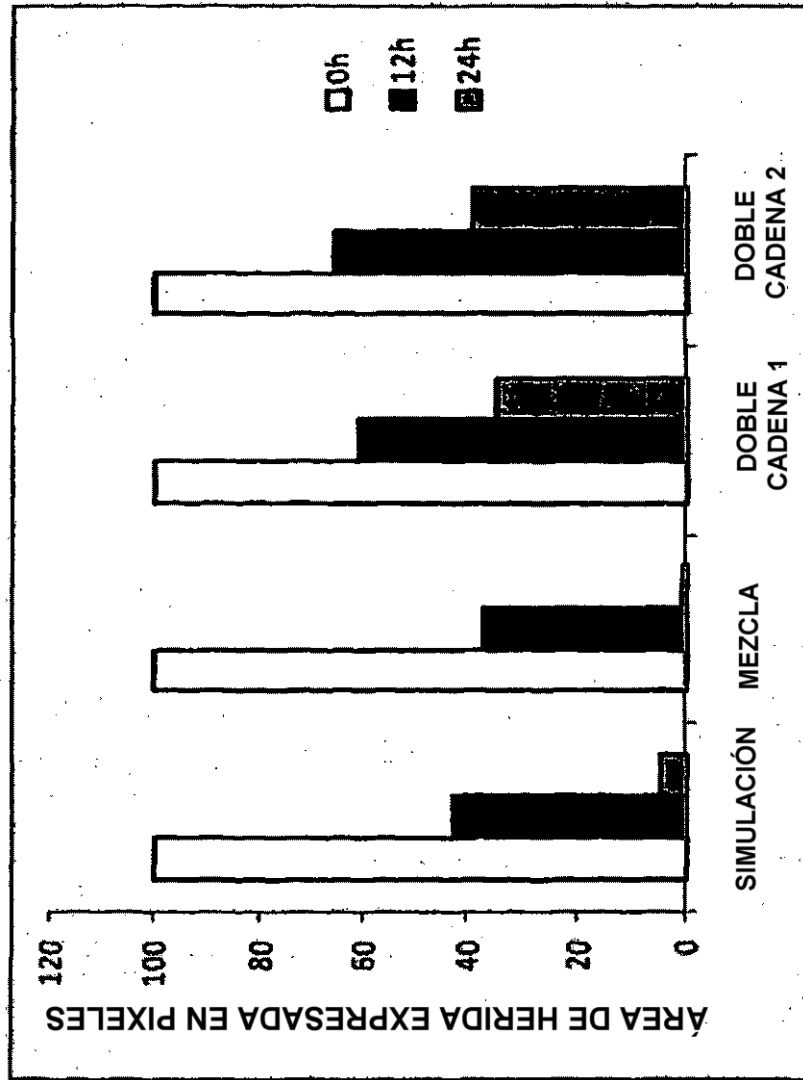


FIGURA 9 (A)

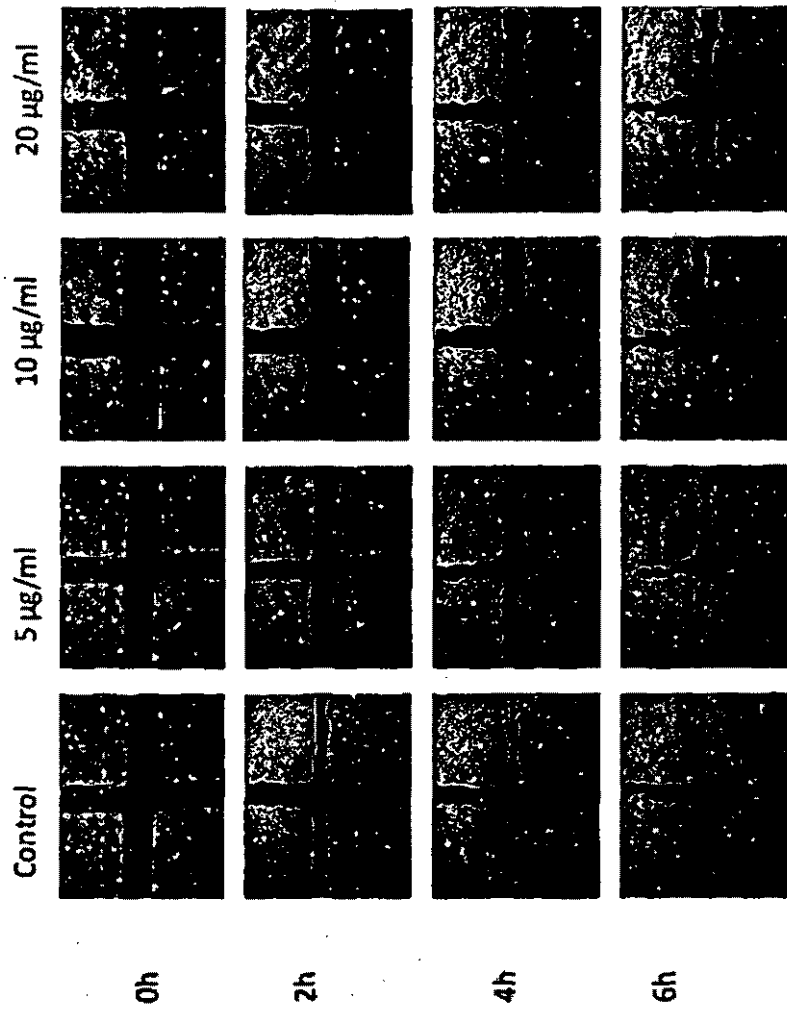


FIGURA 9 (B)

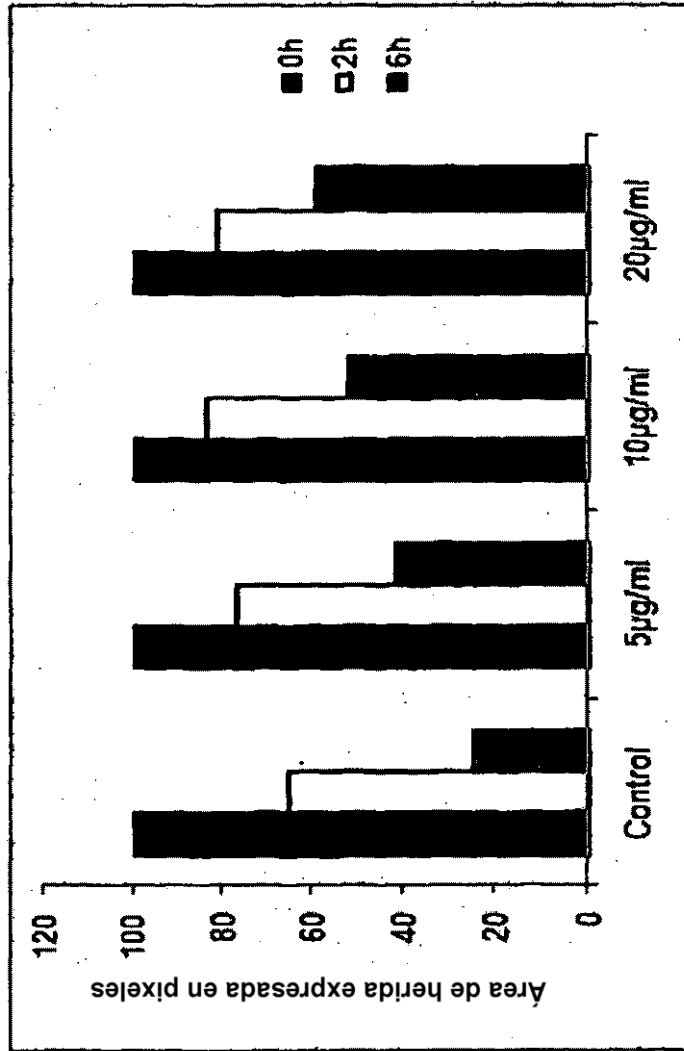


FIGURA 10

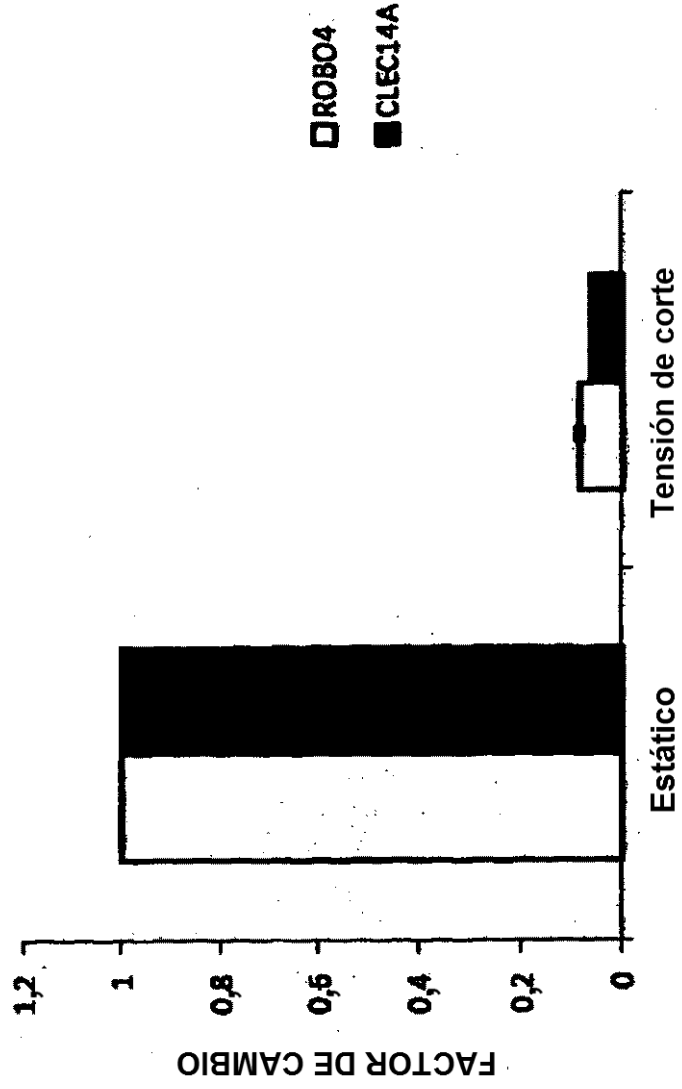


FIGURA 11

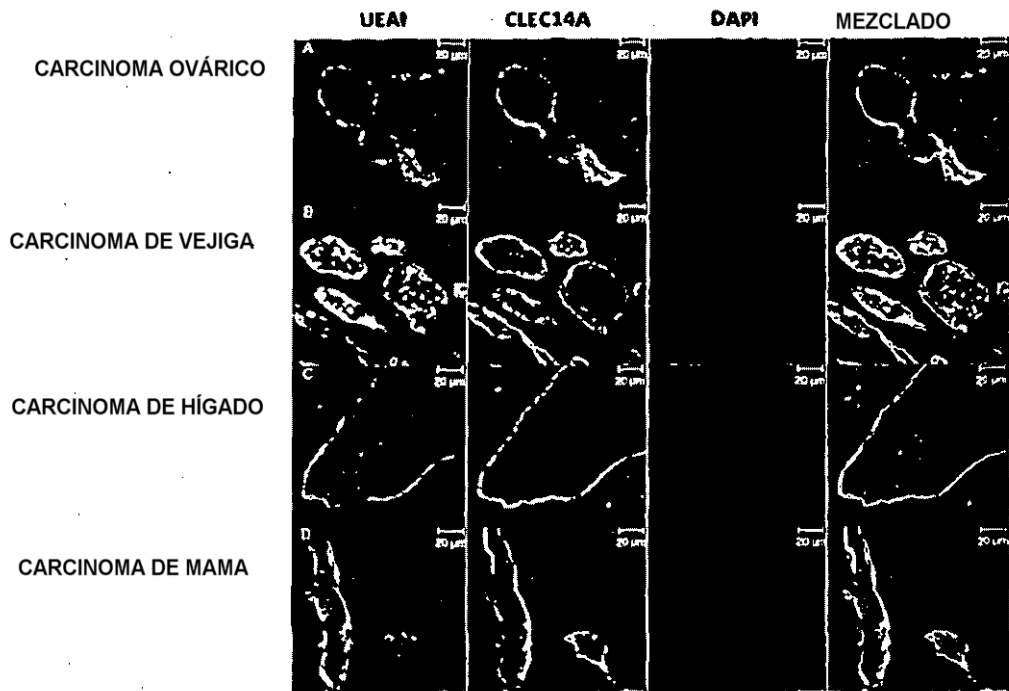


FIGURA 12

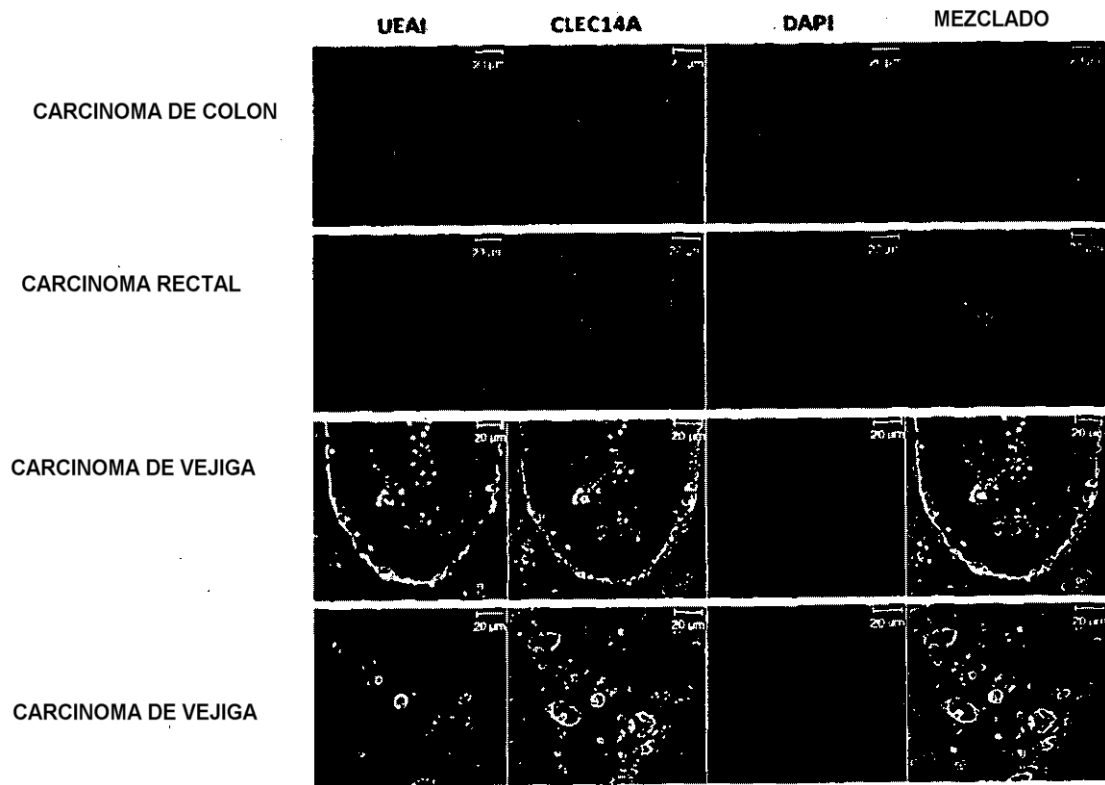


FIGURA 13

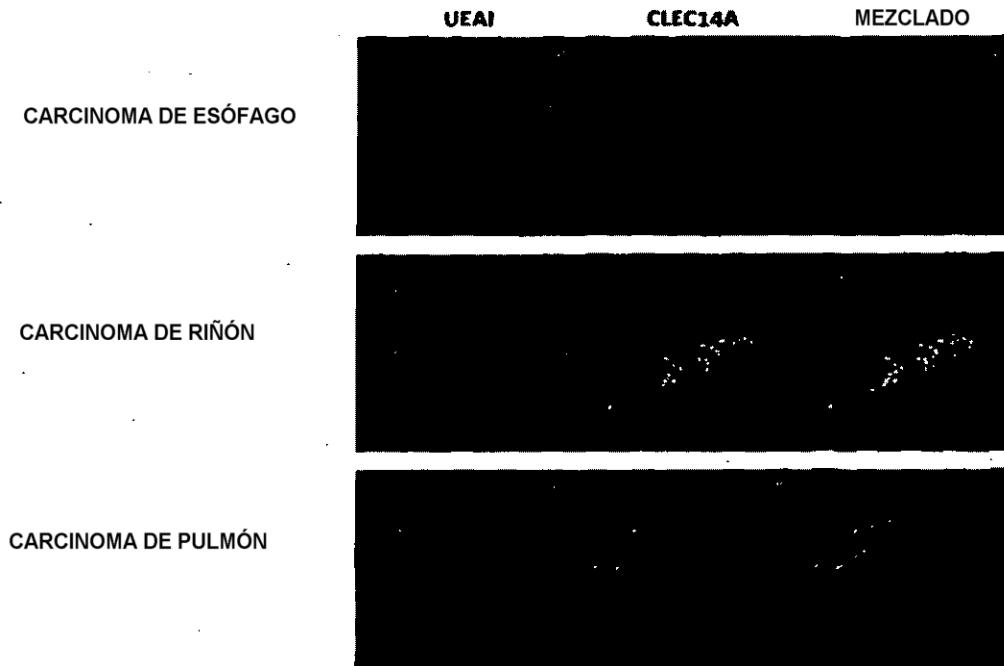


FIGURA 14

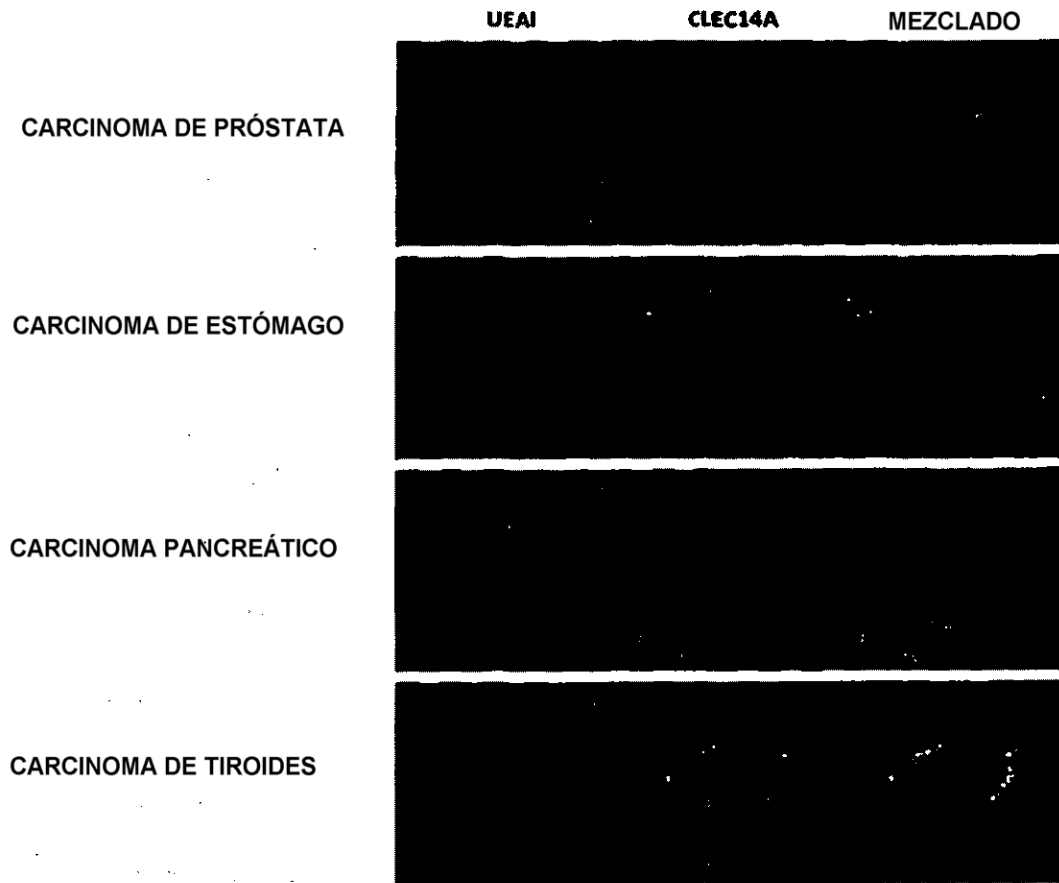


FIGURA 15

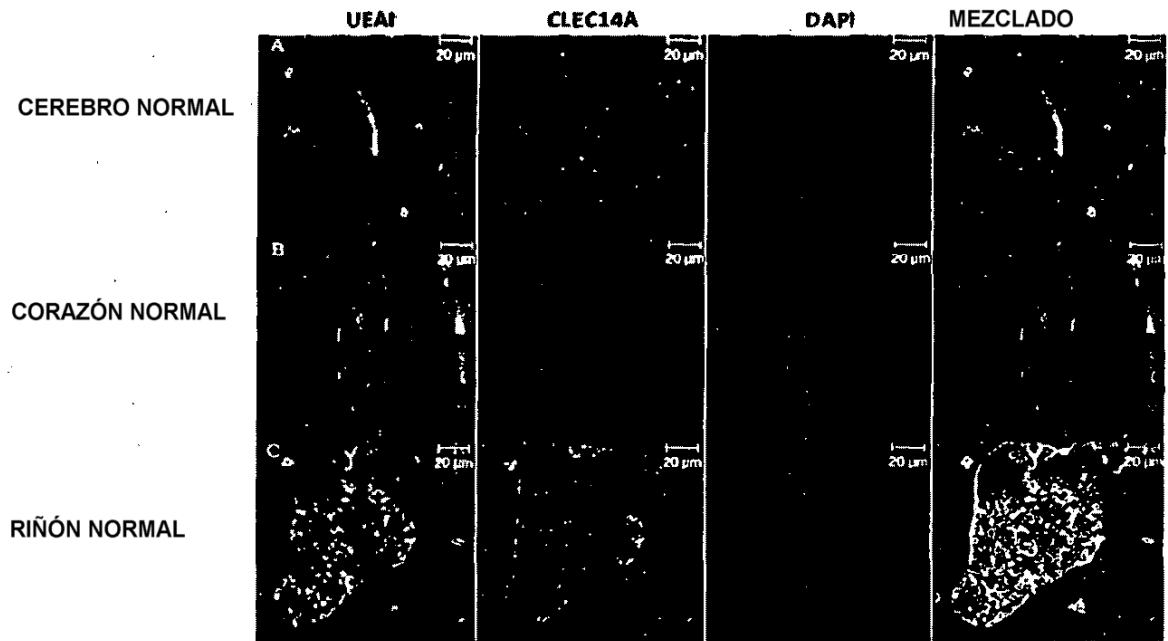


Figura 16 (A)

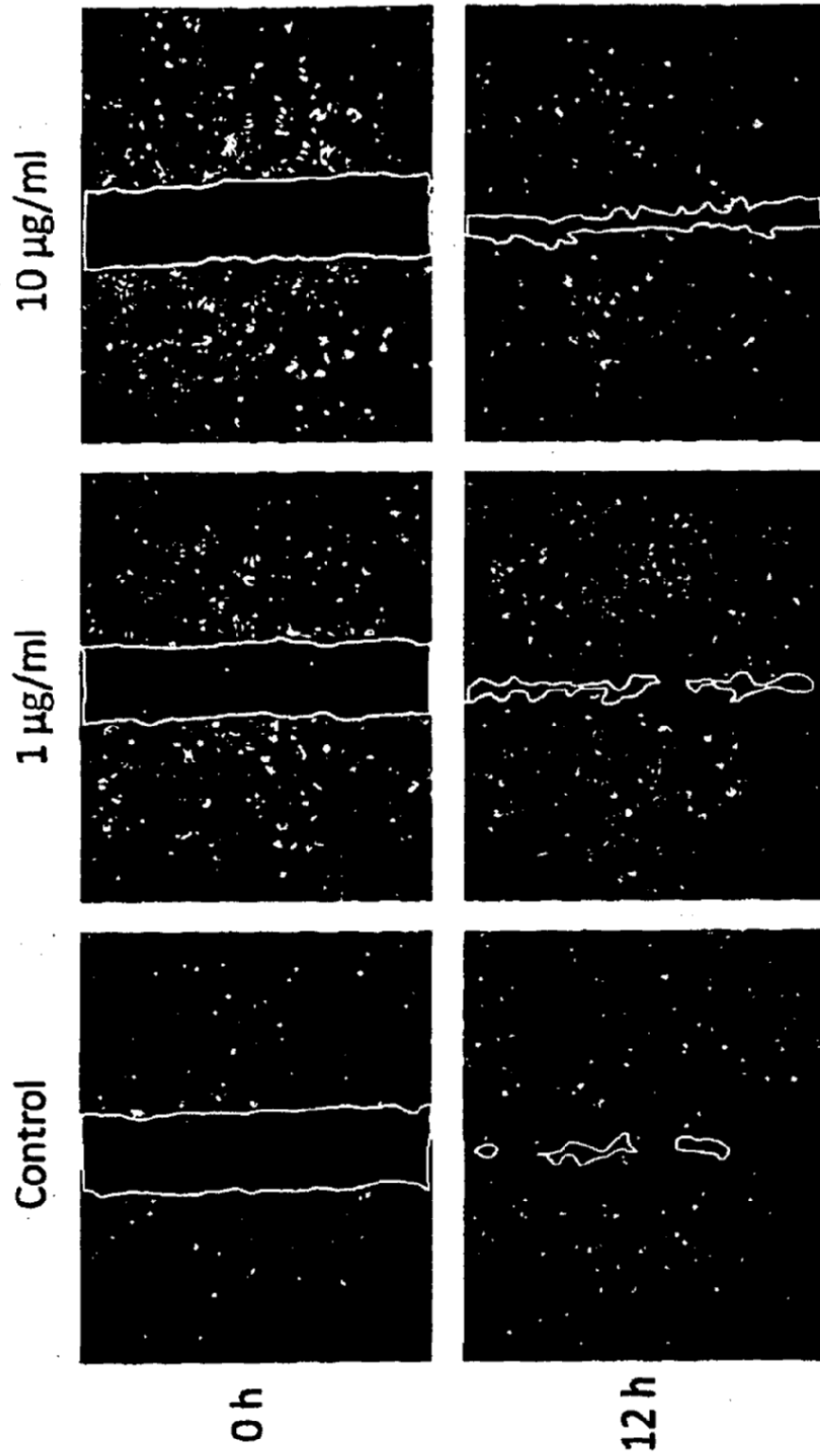


Figura 16 (B)

CRT-3

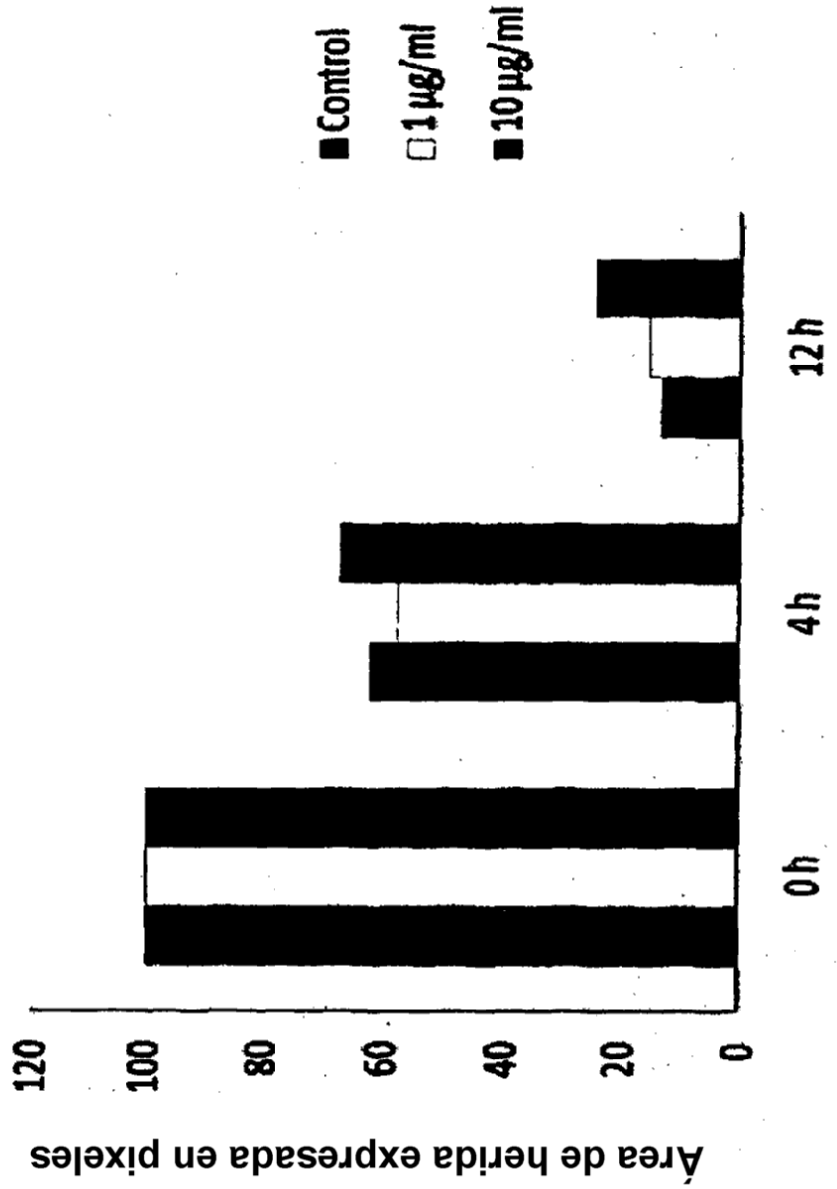


Figura 17 (A)

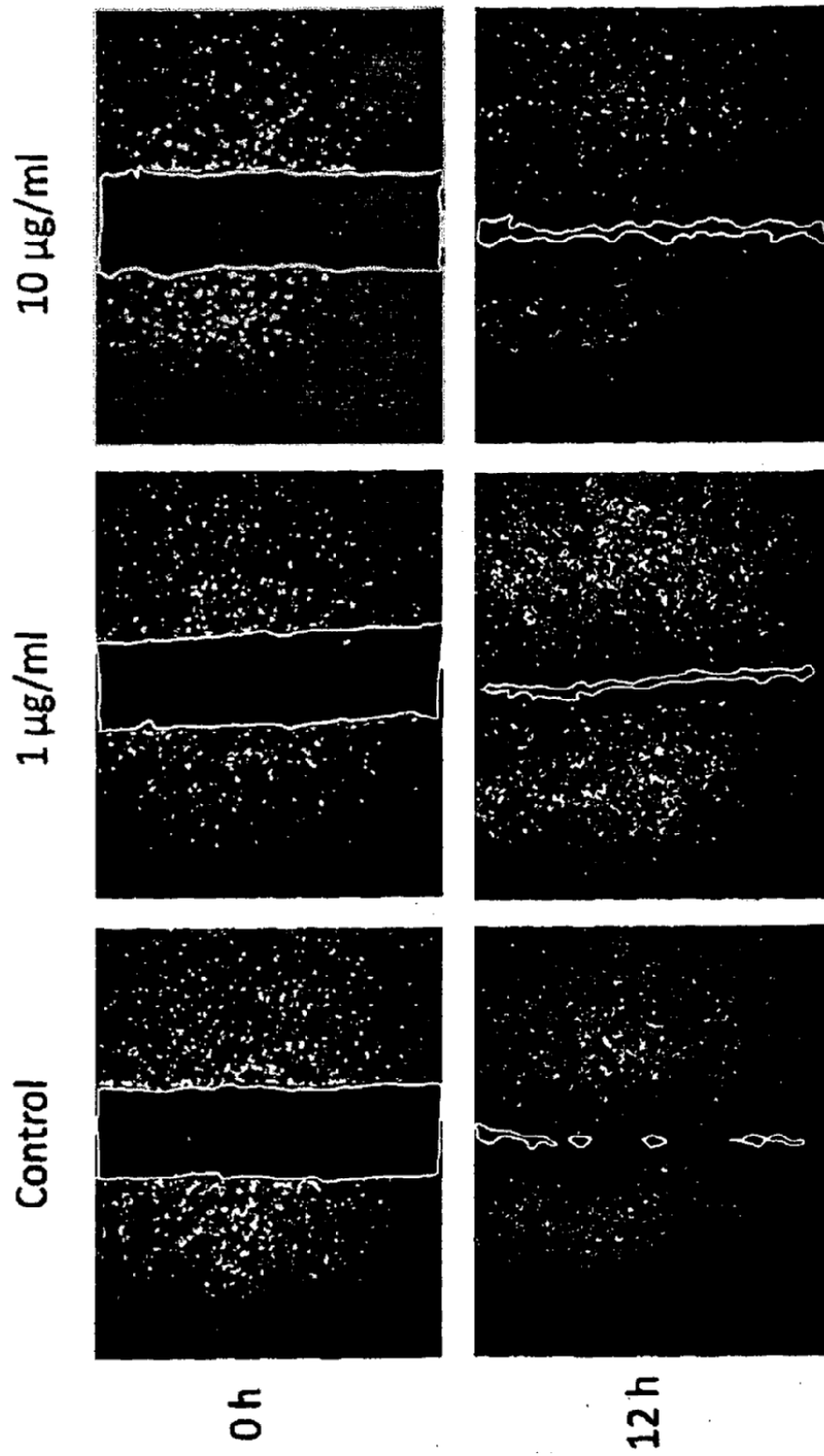


Figura 17 (B)

CRT-2

